

Physikalisch-chemische
Untersuchungen
an Tropokollagenlösungen

von

JÜRGEN ENGEL

1962

Physikalisch-chemische Untersuchungen an
Tropokollagenlösungen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Jürgen Engel
aus Berlin
am



1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Graßmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G.-M. Schwab

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 12. 1962

Meinen Eltern



Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung, München, in der Zeit von Dezember 1959 bis August 1962 durchgeführt.

Meinen verehrten Lehrern

Herrn Professor Dr. W. Graßmann und

Herrn Professor Dr. G.-M. Schwab

danke ich herzlich für die Themastellung und Anleitung zu dieser Arbeit.

Besonders dankbar bin ich Herrn Professor Dr. W. Graßmann für die große Förderung, die mir in seinem Institut zuteil wurde.

Ebenfalls möchte ich

Herrn Dr. K. Hannig

für viele Anregungen und Diskussionen danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555213_0063

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	Seite 1
	I.1 Kollagen	1
	I.2 Lösliches Kollagen (Tropokollagen)	2
	I.3 Denaturierung	4
	I.4 Rückbildung einer kollagenähnlichen Struktur	5
	I.5 Aufgabenstellung	6
II	Material und Methoden	7
	II.1 Herstellung des Untersuchungsmaterials	7
	II.2 Puffer	10
	II.3 Konzentrationsbestimmung	11
	II.4 Optische Drehung	11
	II.5 Brechungsunterschied	11
	II.6 Viskosimetrie	12
	II.7 Diffusion	12
	II.8 Sedimentation	19
	II.9 Partialvolumen	20
	II.10 Lichtstreuung	20
	II.11 Temperaturmessung	22
	II.12 Berechnung der molekularen Größen	22
III	Das native Tropokollagen	30
	III.1 Literaturergebnisse	30
	III.2 Eigene Resultate und Diskussion	32
	III.3 Schlußdiskussion	39
IV	Das denaturierte Tropokollagen	41
	IV.1 Literaturergebnisse	41
	IV.2 Eigene Resultate und Diskussion	44
	IV.3 Schlußdiskussion	49
V	Der Denaturierungsvorgang	52
	V.1 Einführung und Literaturergebnisse	52
	V.2 Eigene Resultate	54
	V.3 Reaktionskinetische Analyse	60
	V.4 Reaktionsordnung	63
	V.5 Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit	69
	V.6 Diskussion	70

VI	Der Renaturierungsvorgang	Seite	74
	VI.1 Einleitung		74
	VI.2 Eigene Ergebnisse		78
	a) Verfolgung der Renaturierung mit Lichtstreuung, Viskosität und op- tischer Drehung		78
	b) Schaukelmethode der Renaturierung durch Abwechseln von 4 auf 22°C		82
	c) Denaturierungsverhalten von ver- schieden denaturiertem und rena- turierten Tropokollagen		86
	d) Ultraazentrifugenuntersuchungen an renaturiertem Tropokollagen		96
	e) Ausfällung von Fibrillen und Long- spacing-Segmenten aus renaturier- ten Tropokollagenlösungen		106
	VI.3 Diskussion		108
VII	Erklärung der Symbole		115
VIII	Zusammenfassung		117
IX	Literatur		121

I. EINLEITUNG

I.1 Kollagen

Das Kollagen ist ein Hauptbestandteil der Haut und des Bindegewebes, der Sehnen und der Knochen. Es dient dem Organismus als Gerüstsubstanz und findet sich mit gewissen Schwankungen seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften in Warm- und Kaltblütlern.

Das Kollagen ist ein Faserprotein und bildet in der Haut ein dreidimensionales Flechtwerk scheinbar endloser Fasern, von denen die dicksten noch mit bloßem Auge sichtbar sind. Diese bestehen aus Bündeln von Fibrillen, die einen Durchmesser von 100 - 1000 Å haben. An gequollenen¹⁾ oder längere Zeit im Elektronenmikroskop bestrahlten Fibrillen²⁾ erkennt man, daß diese aus feinsten, in der Längsrichtung gelegten Untereinheiten, den Filamenten, aufgebaut sind; diese bestehen ihrerseits aus wenigen Prototfibrillen mit dem Durchmesser des monomeren Kollagenmoleküls (14 Å). Eine Fibrille zeigt im Elektronenmikroskop eine hochstrukturierte Querstreifung. Diese wird wesentlich verstärkt, wenn man Verbindungen mit schweren Atomen wie Phosphorwolframsäure oder Uranylacetat einlagert. Da das Phosphorwolframsäureanion von basischen Gruppen - z.B. der Guanidinogruppe des Arginins - und das Uranylkation von sauren Resten - z.B. der freien Carboxylgruppe der Asparagin- oder Glutaminsäure - gebunden wird, wurde die Querstreifung durch ein Abwechseln saurer oder basischer Bereiche, die eine Schwärzung ergeben, mit Bereichen, in denen sich vorwiegend neutrale Aminosäuren befinden, erklärt^{3,4)}. Das Muster der Querstreifung der natürlichen Fibrille wiederholt sich in Perioden von 650 Å^{5,6)}. Das Kollagenmonomere hat jedoch die etwa vierfache Länge und baut durch mauerwerkähnliche Viertelüberlappung die Faser auf^{7,8,9)}. Das Prinzip des Aufbaus ist dabei offenbar die möglichst vollständige Absättigung der elektrostatischen Kräfte, indem sich möglichst viele basische Bereiche des einen Moleküls mit möglichst vielen sauren des anderen und umgekehrt zusammenordnen⁹⁾.

Röntgenstrukturuntersuchungen an gestreckten Fibrillen deuten daraufhin, daß sich deren feinste Untereinheiten, die Protofibrillen, aus drei Polypeptidspiralen aufbauen, die mit schwachem Rechtsdrall seilartig zu einer übergeordneten Helix verwunden sind¹⁰⁾. Mit diesem Modell ist auch der in keinem anderen Protein vorkommende hohe Anteil an Iminosäuren (Prolin und Oxyprolin, zusammen etwa 30 Mol-%) vereinbar. Diese verhindern den Aufbau der sonst bei Eiweißen viel zu findenden, einfachen α -Helix, da sie keine Wasserstoffbrücken in Achsenrichtung ausbilden können und der Pyrrolidinring außerdem verschiedene sterische Besonderheiten bedingt. Das verhältnismäßig reflexarme Röntgendiagramm des Kollagens allein läßt sich jedoch auch noch durch andere, teilweise recht verschiedene Strukturvorschläge erklären¹¹⁾. Das obige, heute allgemein anerkannte Modell von Rich und Crick¹⁰⁾ konnte erst unter Zuhilfenahme der physikalisch-chemischen Untersuchungsergebnisse an dem löslichen Monomeren des Kollagens weitgehend bewiesen und in den Einzelheiten ausgebaut werden¹¹⁾.

Überhaupt wäre die Aufklärung des physikalischen Aufbaus der Kollagenfasern nicht allein aus den Messungen an festem Kollagen möglich gewesen, auch die Kenntnis der molekularen Daten des Kollagenmonomeren sind dafür nötig. Der größte Teil des Kollagens ist jedoch nur unter chemischer und struktureller Veränderung (Denaturierung), z.B. durch Behandeln mit starker Säure oder Alkali und nachfolgendes Kochen der neutralisierten Hautaufschwämmung (Gelatineherstellung) in Lösung zu bringen. Die so erhaltenen, löslichen Produkte erlauben kaum noch Rückschlüsse auf das native Kollagenmolekül.

I.2 Lösliches Kollagen

Es war deshalb ein großer Fortschritt in der physikalisch-chemischen Erforschung des Kollagens, als gefunden wurde, daß besonders aus jungen Organen ein geringer Teil des nativen Kollagens in der Kälte mit schwachen Säuren oder sauren Puffern extrahierbar ist^{12,13)}. Später fand man sogar, daß

ein noch kleinerer Teil unter physiologischen Bedingungen, z.B. mit neutraler Kochsalzlösung extrahiert wird¹⁴⁾. Es handelt sich hierbei um Vorstufen des reifen Kollagens, welche noch nicht durch intermolekulare Verbrückungen unlöslich geworden sind¹⁵⁾. Die Fibrillen des vernetzten, reifen Kollagens sind, wie erwähnt, nur unter drastischen Bedingungen löslich, wobei die Quervernetzungen, wie auch ein Teil der Peptidketten zerstört werden. Die aus unvernetztem, löslichen Kollagen gebildeten Fibrillen (s. unten) sind in schwachen Säuren und sauren Puffern, nicht aber unter physiologischen Bedingungen löslich. Das unter diesen Bedingungen extrahierbare Kollagen hat sich im Organismus offenbar noch nicht in Fibrillenform abgeschieden. Beide löslichen Kollagenarten werden mit Tropokollagen bezeichnet.

Sowohl aus sauer wie auch aus neutral extrahierten Tropokollagenlösungen kann man durch Verschieben des pH ins Alkalische, durch Herabsetzen der Ionenstärke im Neutralen (Dialyse gegen Wasser) oder durch Erwärmen von neutralen Lösungen Fibrillen ausfällen^{12,16)}. Diese zeigen die normale Querstreifung im Elektronenmikroskop und sind auch sonst, abgesehen von ihrer Löslichkeit in sauren Puffern und Säuren, chemisch und physikalisch (Röntgenstruktur usw.) mit den Fibrillen des reifen Kollagens identisch. Die Struktur des reifen Kollagens muß demnach in den Molekülen des Tropokollagens bereits vorgegeben sein.

In Gegenwart eines anionischen Polyelektrolyten, z.B. ATP, sind die Ladungen der Moleküle, die sonst die Viertelüberlappung bedingen, teilweise abgesättigt und es kann statt der Fibrillenbildung ausschließlich eine seitliche Anlagerung, bei der die Enden der Moleküle abschneiden, im Elektronenmikroskop beobachtet werden. Es bilden sich sogenannte Long-spacing-Segmente mit einer Länge von etwa 3000 Å¹⁷⁾.

Das sauer extrahierbare Kalbshautkollagen hat ein Molekulargewicht von etwa 350 000 und besitzt die Form eines steifen Stäbchen mit einer Länge von ca. 2800 Å und einem Durchmesser

von 14 Å¹⁸⁾. Die außerordentlich hohe, negative optische Drehung deutet auf eine sehr geordnete Anordnung der Aminosäurereste im Molekül. Die Kollagenstruktur nach Rich und Crick (s. I.1) ist auch in der Lösung stabil und verleiht dem Molekül eine für seine geringe Dicke außerordentlich hohe Festigkeit. Enzymatisch ist das native Kollagen nur von einem Enzym, der Kollagenase, angreifbar.

I.3 Denaturierung

Erwärmt man saure Tropokollagenlösungen, so tritt oberhalb einer ziemlich scharfen Temperatur eine Zerstörung der geordneten Struktur ein, was sich u. a. im raschen Abfall der optischen Drehung und der Viskosität bemerkbar macht. Dieser Vorgang, der Denaturierung genannt wird, führt schließlich auch zu einem Zerfall in die Einzelketten, aus denen die Tripelhelix aufgebaut war. Dabei zerfallen die Moleküle des neutralextrahierten Kollagens in drei gleich große Peptidketten¹⁹⁾; im denaturierten, sauerextrahierten Material findet man daneben Moleküle mit etwa doppeltem Molekulargewicht²⁰⁾, die wahrscheinlich durch zwei schon im nativen Molekül verbundene Peptidketten gebildet werden¹⁸⁾. Die Peptidketten liegen in der Form statistischer Knäuel vor. Sie sind im Gegensatz zum nativen Tropokollagen, z.B. von Trypsin, Chymotrypsin und Pepsin leicht abbaubar; auch der Angriff der Kollagenase ist erleichtert²¹⁾.

Die Denaturierung von löslichem Kollagen hat ihr Analogon in der Schrumpfung der Fibrillen des reifen Kollagens, nur liegt die gleichfalls sehr scharfe Schrumpfungstemperatur weit höher als die Denaturierungstemperatur. Im unlöslichen, reifen Kollagen wird die zerstörte Struktur jedoch noch durch die schon erwähnten, intermolekularen Vernetzungen zusammengehalten, so daß die durch Verlust der starren Anteile zusammengeschrumpfte Fibrille unlöslich bleibt. Die aus Tropokollagenlösungen erhaltenen Fibrillen gehen, da in ihnen die Vernetzungen noch fehlen, beim Erreichen der Schrumpfungstemperatur in Lösung.

Durch Anwendung der thermodynamischen Gesetze, die für das Schmelzen kristalliner Phasen in synthetischen Hochpolymeren abgeleitet wurden, kann man zeigen, daß die gegenüber der Denaturierungstemperatur des gelösten Kollagens erhöhte Schrumpfungstemperatur der Fasern nur auf die geringere Konzentration an Lösungsmittel in den Fibrillen zurückzuführen ist²²⁾. Diese und andere Ergebnisse zeigen, daß man den Zusammenbruch der Kollagenstruktur als einen richtigen Schmelzprozeß im Sinne einer Phasenumwandlung auffassen kann. Über den Mechanismus der Denaturierung von Tropokollagen war bisher noch nichts Genaues bekannt. Es wurde vermutet¹⁸⁾, daß die Moleküle ohne Zwischenstufen spontan in ihre Komponenten zerfallen.

I.4 Rückbildung einer kollagenähnlichen Struktur

Läßt man denaturierte Tropokollagenlösungen bei Temperaturen unterhalb der Denaturierungstemperatur stehen, so scheint sich eine dem Kollagen zum mindesten ähnliche Struktur zurückzubilden^{21,23,24,25)}. So steigen z.B. die optische Drehung und die Viskosität langsam wieder an. Die enzymatische Angreifbarkeit der Peptidketten wird sprunghaft beim Unterschreiten der Denaturierungstemperatur wieder erschwert²¹⁾, so daß dieser Schritt einer Phasenumwandlung analog ist.

Der Mechanismus dieser sogenannten Renaturierung (der Ausdruck wird nicht nur im wörtlichen Sinne einer Rückbildung nativer Moleküle gebraucht, sondern auch auf die Ausbildung von Strukturen angewendet, die der nativen ähnlich sind) des Kollagens genießt über das Kollagen hinaus großes theoretisches Interesse, da man daran den Aufbau einer hochgeordneten Eiweißstruktur aus ungeordneten Komponenten in vitro verfolgen kann. Als erster Schritt der Renaturierung wurde die Rückbildung der Helixkonfiguration innerhalb der einzelnen Peptidketten wahrscheinlich gemacht^{21,23,24)}. Die Frage, wie die Einzelhelices sich weiterzusammenfinden und inwieweit die native Tripelhelix oder sogar richtige native Moleküle zurückgebildet werden, blieb unklar. Daß stäbchenför-

mige Teilchen im Prinzip in renaturierten Lösungen wieder auftreten, konnte elektronenmikroskopisch gezeigt werden²⁶⁾, doch waren die quantitativen Verhältnisse schwer abzuschätzen.

I.5 Aufgabenstellung

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, einen tieferen Einblick in den Mechanismus der De- und Renaturierung zu finden. Dabei erschien neben den bereits auf dieses Problem angewendeten Methoden besonders die Methode der Lichtstreuung geeignet, da diese eine gleichzeitige und unabhängige Verfolgung der Form- und der Molekulargewichtsänderungen erlaubt. Von den bisher angewandten Methoden ist z.B. die Viskosität sowohl vom Molekulargewicht als auch von der Form der Moleküle abhängig, und die optische Drehung zeigt nur Konfigurationsänderungen an.

Vor der Inangriffnahme dieser Fragen mußten jedoch die molekularen Daten (Molekulargewicht, Abmessungen usw.) des als Untersuchungsmaterial verwendeten nativen Tropokollagens der Kalbshaut überprüft werden, da die Literaturangaben teilweise sehr stark widersprüchlich sind. Auch sollte geprüft werden, ob die Art der Extraktion und der Reinigung einen Einfluß auf diese Daten hat.

Genau wie für das native waren die Literaturangaben über die molekularen Daten der Denaturierungsprodukte des Tropokollagens und deren quantitative Verhältnisse oft widersprechend und lückenhaft. Es mußte demnach auch eine genaue Untersuchung des denaturierten Zustandes der Untersuchung der De- und Renaturierung vorangehen.

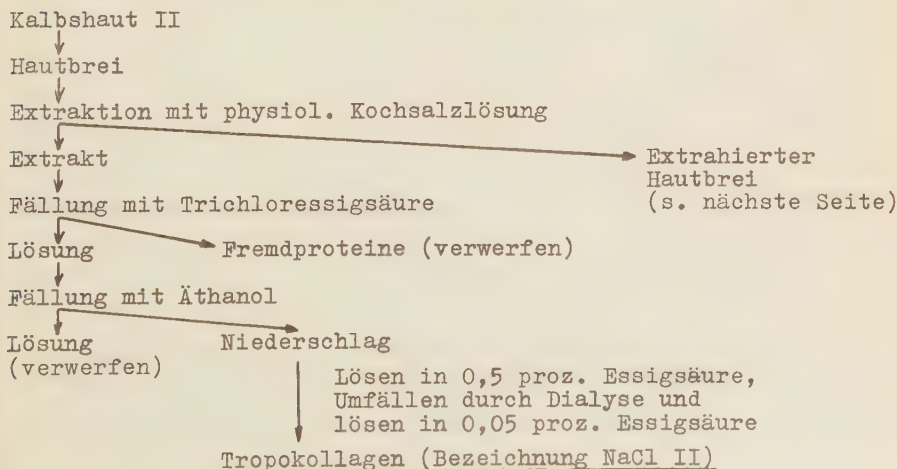
So entspricht die gewählte Einteilung der Arbeit in einen allgemeinen methodischen Teil, in dem die Gewinnung des Materials und die Meßmethoden beschrieben werden, und in vier Kapitel: Messungen am nativen Tropokollagen, Messungen am denaturierten Tropokollagen, Denaturierung und Renaturierung ungefähr der Reihenfolge, in der die Untersuchungen durchgeführt wurden.

II. MATERIAL UND METHODEN

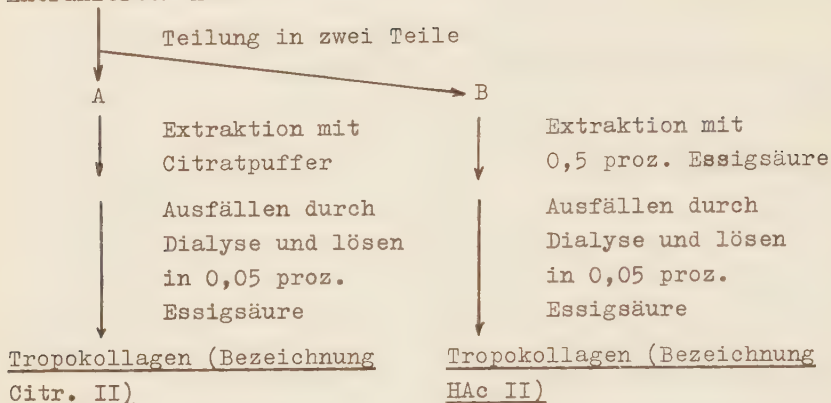
II.1 Herstellung des Untersuchungsmaterials

Für die ersten Versuche wurde eine Kalbshaut (Haut I) nach der Vorschrift von Gallop²⁷⁾ extrahiert. Das so gewonnene Material wurde mit Citr. I bezeichnet. (In dieser Weise werden alle, in dieser Arbeit benutzten Tropokollagenchargen bezeichnet: Der Abkürzung für das verwendete Extraktionsmittel folgt als römische Zahl die Nummer der Haut.) Gallop extrahiert vor der Citratpufferextraktion mit Neutralsalzlösung, um die leicht löslichen Begleitproteine zu entfernen. Diese Lösung wird verworfen. Dabei geht natürlich auch der Teil an Tropokollagen in Lösung, der bereits in der Haut in gelöster Form vorhanden war.

Der Grundgedanke der endgültigen Aufarbeitung der Haut II (s. Schema) war, den Neutralsalzextrakt nicht zu verwerfen, sondern die Verunreinigungen durch Fällungsreaktionen vom Tropokollagen zu trennen, ohne dieses dabei zu denaturieren²⁸⁾. Ein Teil des zurückbleibenden Hautbreis wird dann mit Citratpuffer²⁷⁾ und ein anderer mit verdünnter Essigsäure²⁹⁾ extrahiert. Dadurch sind alle drei in der Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren an der Haut eines Tieres angewendet, so daß vergleichbare Materialien erhalten werden.



Extrahierter Hautbrei



Ein Kalbsfell wurde zuerst wie üblich mit dem Messer von Haaren, Papillarschicht und subcutanem Gewebe befreit und in Stücke von ca. 4 cm² geschnitten. Das Feuchtgewicht dieses Rohmaterials betrug etwa 1,4 kg. Die Stückchen wurden in Form kleiner Kuchen eingefroren und viermal durch den elektrischen Fleischwolf gegeben. Diese und die folgenden Arbeiten wurden im Kühlraum oder nur kurzzeitig außerhalb desselben unter Kühlung mit Eis durchgeführt. Die Gesamtmenge wurde einmal mit 5 Liter und zweimal mit je 2,5 Liter 0,45 m Kochsalzlösung über Nacht extrahiert, die Rückstände in der Kühlzentrifuge bei 25 000 g abzentrifugiert und die nur leicht trüben Extrakte vereint.

Zur Reinigung wurden diese über Nacht gegen 30 Liter Phosphatpuffer pH 7,7; $\mu = 0,4$; dialysiert. Unter Rühren wurde eine 25 proz. Trichloressigsäurelösung zugegeben bis der pH 3,5 erreicht war (Verbrauch etwa 370 ml). Nach fünfständigem Stehen konnte ein hellbrauner Schlamm abzentrifugiert werden. Die Lösung wurde sofort wieder gegen den Phosphatpuffer (dreimal über Nacht gegen 20 Liter) auf den pH 7,7 zurückdialysiert. Zu der Lösung wurde dann Alkohol zuge-
tropft, bis die Alkoholkonzentration 14 % betrug, zur vollständigen Fällung 24 Stunden stehen gelassen und abzentrifugiert. Die Lösung des Sediments in ca. 200 ml 0,5 proz. Essigsäure wurde 24 Stunden gegen Phosphatpuffer pH 7,7 und

anschließend fünfmal 24 Stunden gegen mit Natriumbicarbonat neutralisiertes Wasser dialysiert. Die in den Schläuchen ausgefallenen Fibrillen wurden abzentrifugiert und nach Waschen mit Bicarbonatwasser in 0,05 proz. Essigsäure gelöst. Dem schloß sich eine 24stündige Dialyse gegen 0,05 proz. Essigsäure an, um niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen. Durch Zentrifugation über Nacht bei 40000 g konnte die Lösung wasserklar erhalten werden. Die Ausbeute betrug 250 ml einer 0,25 proz. Lösung (Bezeichnung NaCl II).

Vor der Weiterverarbeitung wurde der Hautrückstand der Natriumchloridextraktion dreimal mit Bicarbonatwasser gewaschen und in zwei gleiche Teile geteilt: A und B.

A) Der Hautbrei wurde zweimal mit je 3 Liter Citratpuffer, pH 3,7; 0,15 m, über Nacht extrahiert und die vereinten Überstände viermal 24 Stunden gegen Bicarbonatwasser dialysiert. Die ausgefallenen Fibrillen wurden gewaschen, in 0,05 proz. Essigsäure gelöst und viermal 24 Stunden gegen 0,05 proz. Essigsäure dialysiert. Eine leichte Trübung konnte durch Zentrifugieren bei 40000 g über Nacht beseitigt werden. Die Ausbeute betrug ca. 3 Liter einer 0,4 proz. Lösung (Bezeichnung Citr. II).

B) Die andere Hälfte des Hautbreis wurde mit je 3 Liter 3 proz. Essigsäure zweimal 24 Stunden extrahiert. Die Masse erfuhr dabei eine starke Quellung, die die Extraktion erschwerte. Die Überstände wurden 24 Stunden gegen 30 Liter Phosphatpuffer, pH 7,7 dialysiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter A beschrieben. Die ausgefallenen Fibrillen sahen im Gegensatz zu denen der anderen Fraktionen glasig aus und hatten eine gummiartige Konsistenz. Auch ließ sich hier eine leichte Trübung der Lösung in 0,05 proz. Essigsäure durch langes Zentrifugieren nicht restlos entfernen. Die Ausbeute betrug etwa 2,5 Liter einer 0,45 proz. Lösung (Bezeichnung HAc II).

Die Gesamtausbeute betrug im Neutralauszug etwa 70mg gereinigtes Tropokollagen, für den Citratauszug 1,2 g und für den Essigsäureauszug 1,1 g. Zusammen sind dieses 0,17 % (bezogen

auf das Feuchtgewicht der Haut) an löslichem Kollagen. Das Material wurde in Lösung in 20 ml - Portionen eingefroren aufbewahrt.

Einige der letzten Untersuchungen (s. VI) wurden an einem durch Citratextraktion aus einer dritten Haut (Haut III) hergestellten Material (Bezeichnung Citr. III) durchgeführt. Dessen Darstellung erfolgte nach Abtrennung der neutral extrahierbaren Anteile wie unter A beschrieben.

II.2 Puffer

Citratpuffer, pH 3,7; Gesamtmolarität $m = 0,50$; Ionenstärke $\mu = \text{ca. } 0,4$;

53,57 g (0,15 m) Natriumcitrat $\cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ zusammen mit etwa 63 g Citronensäure $\cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ lösen und auf fast 1 Liter auffüllen. Mit etwas Citronensäure nachstellen und auf genau 1 Liter auffüllen. Die zur Auswertung der in diesem Puffer durchgeführten Messungen benötigten Werte (Erklärung der Symbole s. VII) sind (gemessen bei 20°C): $\eta = 1,37 \text{ cP}$; η_{rel} (bezogen auf Wasser) = 1,305 und $\rho = 1,0464 \text{ g/ml}$.

Citratpuffer, pH 3,7; Gesamtmolarität $m = 0,25$; Ionenstärke $\mu = \text{ca. } 0,2$;

Wie oben, aber nur 26,79 g (0,075 m) Natriumcitrat $\cdot 5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ mit 31,5 g Citronensäure $\cdot 1 \text{H}_2\text{O}$ lösen. Dafür gelten bei 20°C : $\eta = 1,13 \text{ cP}$; η_{rel} (bezogen auf Wasser) = 1,108 und $\rho = 1,0223 \text{ g/ml}$.

Veronalpuffer, pH 8,4; Gesamtmolarität $m = 0,15$;

Zwei Vorratslösungen: A) 30,9 g Natriumbarbiturat in 1 Liter
B) 0,15 m Salzsäure

82,1 Teile A mit 17,9 Teilen B mischen.

Phosphatpuffer, pH 7,7; $\mu = 0,4$;

81,6 Teile 0,164 m Natriumhydrogenphosphat mit 18,4 Teilen 0,63 m Natronlauge mischen.

II.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen wurden durch Stickstoffanalysen nach Kjeldahl in den Lösungen bestimmt. (Tropokollagen enthält 17,8 % Stickstoff). Da die mit diesen Werten ermittelte spezifische Drehung ausgezeichnet mit den verlässlichsten Literaturwerten¹⁸⁾ übereinstimmte, wurden später diese und die Messung des Brechungsunterschiedes (Annahme $dn/dc = 0,185 \text{ ml/g}$) zur Konzentrationsbestimmung herangezogen.

II.4 Optische Drehung

Die Messungen erfolgten in einem lichtelektrischen Präzisionspolarimeter der Firma Carl Zeiss, Oberkochen mit einer Meßgenauigkeit von $\pm 0,0025^\circ$. Die Temperierung der Zelle geschah auf $\pm 0,1^\circ \text{ C}$ und die für die kinetischen Untersuchungen wichtige Aufheizzeit, die benötigt wurde, um eine Probe von Zimmertemperatur auf etwa 35° C zu erwärmen, betrug 3 - 4 min. Von den fünf zur Verfügung stehenden Wellenlängen (578, 546, 436, 405 und 365 m/ μ) wurde für die kinetischen Messungen die Wellenlänge von 405 m/ μ bevorzugt, da bei dieser die Ausschläge schon sehr groß sind, ohne daß eine so hohe Beeinflussung durch leichte Trübungen wie bei 365 m/ μ zu befürchten ist. Die spezifische optische Drehung beim Licht der D-Linie des Natriums wurde zum Vergleich mit Literaturangaben durch graphische Extrapolation auf 589 m/ μ erhalten.

II.5 Brechungsunterschied

Die Messung des Brechungsunterschiedes erfolgte zur sehr genauen Konzentrationsbestimmung z.B. vor der Diffusion (s.dort) mit dem tragbaren Laboratoriumsinterferometer nach Löwe der Firma Carl Zeiss, Jena. Das Gerät arbeitete mit dem Licht einer Wolframfadenlampe. Die Messungen konnten nur bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Für die Konzentrationsbestimmungen wurde für das Tropokollagen als Brechungsindexinkrement der Mittelwert für Proteine bei weißem Licht $dn/dc = 0,185 \text{ ml/g}$ ³⁰⁾ angenommen. Das für Lichtstreuungsmessungen benötigte

Brechungsindexinkrement für 436 m/ μ konnte mit dem Gerät nicht ermittelt werden. Es wurde ebenfalls der Mittelwert für Proteine $dn/dc = 0,193 \text{ ml/g}$ ³⁰⁾ angenommen, der mit Literaturwerten für Rattenschwanzkollagen gut übereinstimmt³¹⁾.

II.6 Viskosimetrie

Die verwendeten Viskosimeter waren Ubbelohdeviskosimeter der Firma Schott, Mainz. Die Aufheizzeit und Temperaturkonstanz entsprachen ungefähr denen der optischen Drehung. Es wurde die relative Viskosität $\eta_{\text{rel}} = \eta_{\text{Lösung}}/\eta_{\text{Puffer}}$ gemessen und daraus die spezifische Viskosität $\eta_{\text{spez.}} = \eta_{\text{rel}} - 1$ berechnet.

II.7 Diffusion

Es wurde die Fokal B Apparatur der Firma Strübin, Basel, mit einer Tiseliuszelle für freie Diffusion verwendet. Die Schwierigkeit bei der Tiseliuszelle (s. Abb. 1) ist die verwirbelungsfreie Verschiebung der unten im verschiebbaren Schliff S entstandenen Grenzschicht nach oben in den optischen Strahlengang.

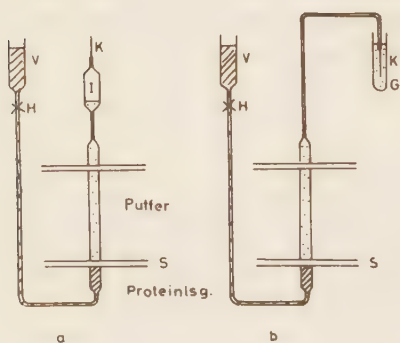


Abb. 1

Diffusionszelle nach Tiselius

a) Käufliche Anordnung

b) Modifizierte "

V = Vorratsgefäß

H = Hahn

S = Verschiebbarer
Planschliff

K = Kapillare

I = Luftpolster

G = In der Höhe verstell-
bares Gefäß

Bei der Anordnung der Abb. 1a sollte die Kapillare K eine langsame und gleichmäßige Verschiebung bewirken. Versuche mit

Farbstofflösungen zeigten jedoch, daß auch bei sehr langsamen Öffnen des Hahnes H am Vorratsgefäß V zuerst eine ruckartige Verschiebung der Grenzschicht nach oben erfolgte, bis das Luftpolster im Raum I komprimiert war. Das Problem der Unterschichtung wird naturgemäß immer schwieriger, je geringer der Konzentrations- bzw. Dichteunterschied zwischen Eiweiß- und Pufferlösung wird. Da bei möglichst geringen Eiweißkonzentrationen gemessen werden sollte, wurde die käufliche Anordnung in folgender Weise modifiziert (Abb 1b). Die gesamte obere Zelle ist jetzt mit Puffer gefüllt. Das Gefäß G wird bei geschlossenem Hahn H so verschoben, daß kein Niveauunterschied zwischen V und G besteht. Jetzt kann der Hahn ohne besondere Vorsicht geöffnet werden. Das Gefäß G wird beliebig langsam nach unten verschoben. Die Kapillare K ist so dimensioniert, daß bei etwa 2 cm Niveauunterschied eine Laufzeit der Schicht von etwa 30 min. für 0,5 cm Zellhöhe erreicht wird.

Die Optik des Gerätes gestattet Aufnahmen nach dem Verfahren von Philpot-Svensson und mit der Phasenplatte. Diese geben den differenzierten Verlauf des Brechungsunterschiedes in der Grenzzone wieder (dn/dx nach x - Diagramme). Ein Beispiel zeigt Abb. 2. Außerdem konnten Rayleigh-Interferenz-Aufnahmen vom Multi-Fringe-Typ³²⁾ gemacht werden, die den direkten Verlauf des Brechungsindex angeben (n nach x - Diagramme) (Abb. 3).

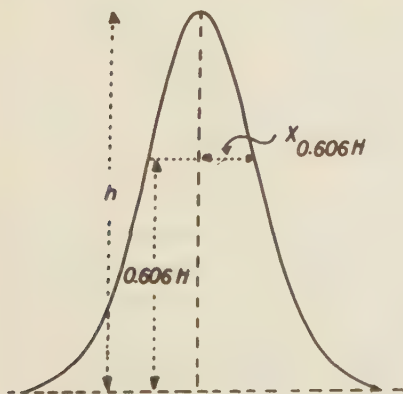


Abb. 2

Phasenplattenaufnahme =
 dn/dx nach x - Diagramm
 (schematisch)

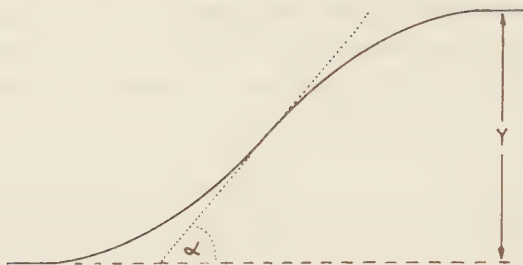


Abb. 3 (schematisch)

Rayleigh Interferenzaufnahme = n nach x - Diagramm

Da das Brechungsindexinkrement dn/dc bei Proteinen fast konzentrationsunabhängig ist, geben die Aufnahmen in erster Näherung auch den Verlauf dc/dx nach x bzw. c nach x wieder. Als Filmmaterial für die Rayleighaufnahmen zeigte sich Agepan (Agfa Leverkusen) (Belichtung ca. 5 - 10 sec, 6 min. Entwicklung in Metol-Hydrochinon 1:8) als günstig. Die Phasenplatten- und Philpot-Svensson-Aufnahmen wurden auf Adox KB 17 (Belichtung ca. 20 sec, gleiche Entwicklung) gemacht.

Experimentell nicht immer einfach zu erreichen ist die Bedingung, daß der Konzentrationsgradient nur von der zu untersuchenden Substanz gebildet wird. Bei reinen Substanzen in reinen Lösungsmitteln (z.B. Rohrzucker in Wasser gegen Wasser) bestehen keine Schwierigkeiten. Es ist allerdings darauf zu achten, daß das Wasser gleichmäßig mit Luft gesättigt ist. Ich verwendete deshalb destilliertes Wasser aus einem Ballon, der lange bei Raumtemperatur gestanden hatte und setzte die Lösungen jeweils frisch vor der Diffusion gegen das gleiche Wasser an. Löst man eine reine Substanz in Puffer, so kann man durch die dadurch bedingte Volumenänderung bereits beachtliche Puffergradienten erhalten, wenn man gegen den gleichen Puffer diffundieren läßt. Im Falle eines Proteins wird es fast immer notwendig sein, die Salzkonzentration vorher auszugleichen. Hierbei muß man sich vor Augen halten, daß bei einer Proteinkonzentration von 0,1 % ein verbleibender Unterschied in der Pufferkonzentration von 0,01 % bereits einen

Extragradienten, der 10 % des Proteingradienten ausmacht, bewirkt. Da der Diffusionskoeffizient des Salzes nun um etwa zwei Zehnerpotenzen höher liegt als der des Proteins, ergeben sich große Fehler. Beträgt die Salzkonzentration des Puffers, z.B. 3 g/100 ml, so bewirken bei 100 ml Gesamtvolumen eine Verdunstung von 0,3 ml bereits eine Erhöhung der Pufferkonzentration um 0,01 %. Deshalb ist auch eine diskontinuierliche Dialyse im offenen Gefäß nach meinen Erfahrungen ungeeignet. Ich verwendete eine kontinuierliche Dialyse, indem ich die Eiweißlösung in die verschlossene Mittelkammer einer kleinen Elektrodialyseapparatur (10 ml-Apparatur der Membranfilter AG, Göttingen) füllte und den Puffer aus einer verschlossenen Flasche durch die Außenkammern strömen ließ. In Abb. 4 zeigt die Kurve I den Verlauf des Ausgleichs bei der Dialyse von 0,50 m Citratpuffer in der Innenkammer gegen 0,25 m Citratpuffer.

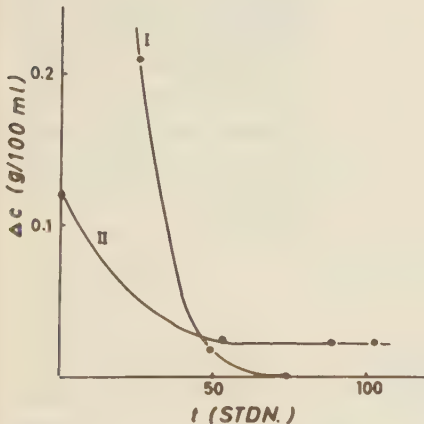


Abb. 4

Einstellung des Dialysegleichgewichts in der kontinuierlichen Dialyse.

Kurve I: 0,50 m Citratpuffer gegen 0,25 m Citratpuffer.

Kurve II: 0,077 proz. Tropokollagenlösung nativ in 0,25 m Citratpuffer gegen 0,25 m Citratpuffer.

Die Konzentrationsunterschiede wurden interferometrisch bestimmt. Kurve II zeigt den Verlauf der Dialyse einer 0,077 proz. Tropokollagenlösung in 0,25 m Citratpuffer gegen 0,25 m Citratpuffer. Der Versuch wurde wieder interferometrisch verfolgt. Damit wird jedoch nur der Gesamtunterschied im Brechungsindex gemessen, welcher durch die Summe der beteiligten Substanzen gebildet wird. Ich habe nun die Tropokolla-

genkonzentration an jedem Meßpunkt durch Drehwertsmessungen kontrolliert und den durch das Tropokollagen bedingten Brechungsunterschied vom interferometrisch ermittelten abgezogen. Die resultierenden Werte wurden unter der Annahme, daß der gesamte Restunterschied in der Konzentration aus Puffer bestand, in Konzentrationsunterschiede umgerechnet und in Abb. 4 aufgetragen. Wie diese zeigt, fand kein völliger Ausgleich statt; es stellte sich vielmehr ein Gleichgewicht ein. Unter der Annahme, daß es sich hier um ein Membrangleichgewicht handelt, wurde in den folgenden Diffusionsversuchen der Restunterschied in der Pufferkonzentration kurz vor der Füllung der Zelle durch Zugabe von Wasser (etwa 0,05 ml auf 10 ml Eiweißlösung) im Interferometer ausgeglichen.

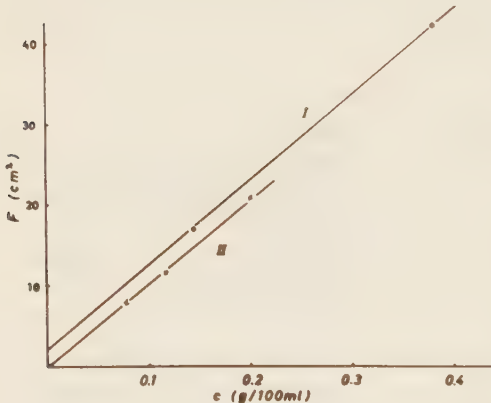


Abb. 5

Flächen (F) der dn/dx -Diagramme bei Diffusionsversuchen aufgetragen gegen die Tropokollagenkonzentration

Kurve I:
Puffergradient durch Dialyse ausgeglichen

Kurve II:
Ausgleich durch Wasserzugabe

Die Abb. 5 zeigt, daß die Gerade, die durch Auftragung der Proteinkonzentration gegen die Fläche der dn/dx nach x - Diagramme (deren Größe ist proportional dem Gesamtkonzentrationsunterschied) entsteht, bei diesen Versuchen durch den Nullpunkt geht. Bei älteren Versuchen, die nur sorgfältig dialysiert waren, verbleibt bei der Proteinkonzentration 0 noch eine geringe Fläche. Außerdem traten bei diesen Versuchen große Unterschiede in den Ergebnissen verschiedener Auswertemethoden auf. Daß diese bei den neuen Versuchen verschwanden, werte ich als Beweis für die Richtigkeit des Ausgleichs mit Wasser (s. III.2, Tab. II).

Alle Diffusionsversuche an Tropokollagen wurden bei $20,0^{\circ}\text{C} \pm 0,05^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

Zur Berechnung der Diffusionskoeffizienten D dient folgende Lösung der allgemeinen Differentialgleichung des Diffusionsproblems (des 2. Fickschen Gesetzes):

$$D = \frac{c_0}{4 \pi t \left(\frac{dc}{dx} \right)_{\max}^2} \quad (1)$$

welche sich für die folgenden Grenzbedingungen ableiten läßt:

1) für $t = 0$ besteht eine unendlich scharfe Grenzschicht,
 2) während der Messung muß an dem einen Ende der Zelle die Anfangskonzentration und an dem anderen Ende die Konzentration Null erhalten bleiben. Dabei bedeuten t die Zeit gerechnet vom Beginn der Diffusion, x die Länge der Zelle in Diffusionsrichtung gemessen von einem beliebigen Nullpunkt, der sich nur im Bereich konstanter Anfangskonzentration befinden muß. $\left(\frac{dc}{dx} \right)_{\max}$ ist die maximale Neigung des Konzentrationsverlaufes in der Zelle. Diese Größe wird im dn/dx nach x - Diagramm (Abb. 2), welches ja den Verlauf der Neigungen angibt, durch die Höhe H gegeben. Die Fläche A unter der Kurve ist proportional dem Gesamtkonzentrationsgefälle c_0 . In dem Rayleigh-Bild (Abb. 3) wird $\left(\frac{dc}{dx} \right)_{\max}$ durch die Neigung der Wendetangente und c_0 durch das in Abb. 3 eingezeichnete Y gegeben. Die Gleichung 1 erscheint dann in der Form

$$D = \frac{A^2}{4 \pi t H^2} \cdot \frac{1}{F^2} \quad (2)$$

bzw.

$$D = \frac{Y^2}{4 \pi t (\operatorname{tg} \alpha)_{\max}^2} \cdot \frac{1}{F^2} \quad (3)$$

Durch Division mit dem Vergrößerungsfaktor F werden die auf dem Film oder der Projektion gemessenen Werte auf die wahren Zellmaße umgerechnet.

Neben dieser als Flächen-Höhen-Methode bekannten Art der Auswertung kann man noch bei den dn/dx nach x - Kurven die ein-

fache Methode der Halbwertsbreite benutzen (s. Abb. 2). Hierbei wird zweckmäßigerweise der x -Wert an der Stelle $0,606 \cdot \text{Höhe (H)}$ gemessen. Der Diffusionskoeffizient berechnet sich dann nach

$$D = \frac{x^2_{0,606 H}}{2 t} \quad (4)$$

Erfahrungsgemäß darf man die Diffusionszeit t nicht vom wirklichen Beginn der Diffusion = Verschiebung der Zelle rechnen, da die 1. Grenzbedingung der Gl. 1 durch unvermeidliche Verwirbelungen nur unvollkommen erfüllt ist. Je nach Güte der gebildeten Grenzschicht ist eine mehr oder weniger große, zunächst unbekannte Nullzeitkorrektur t_k zu addieren. Aus diesem Grunde werden im Falle der Flächenmethode der Quotient aus Fläche²:Höhe² gegen die Zeit aufgetragen (bei der Methode der Halbwertsbreite analog $x^2_{0,606 H}$ gegen t) und D aus der Neigung der resultierenden Geraden berechnet. Der t_k -Wert ergab sich aus dem Schnittpunkt der Abszisse. Ein typisches Beispiel zeigt Abb. 6:

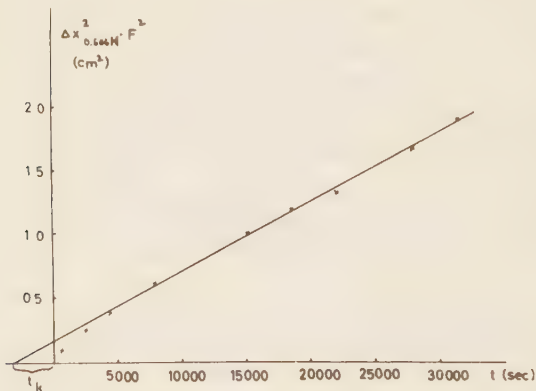


Abb. 6
Auftragung von
 $x^2_{0,606 H}$ gegen
die Zeit
zur Berechnung des
Diffusionskoeffi-
zienten

Man sieht, daß die ersten Meßpunkte nach unten abweichen, da durch Verwirbelungen ein zu hoher Diffusionskoeffizient vorgetauscht wird.

Zur Erprobung der Zelle wurde der Diffusionskoeffizient von Saccharose p.a. (Merck) in Wasser gegen Wasser gemessen. Bei 25° C wurden für $c = 0,5 \%$ die Werte $D = 5,32 \cdot 10^{-6}$ und

$5,34 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ und für $c = 0,1 \%$ zweimal der gleiche Wert $D = 5,33 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{sec}$ erhalten. Die verlässlichsten Literaturwerte^{32,33)} für die gleiche Temperatur und $c = 0,5 \%$ sind $5,22 \cdot 10^{-6}$ und $5,23 \cdot 10^{-6}$.

II.8 Sedimentation

Die Messungen erfolgten mit einer Ultrazentrifuge der Firma Escher-Wyss, Schweiz³⁴⁾. Der Rotor läuft bei dieser Maschine in einer Atmosphäre von 20 mm Wasserstoff, und die Temperatur wird in etwa 5 mm Entfernung vom Rotor abgetastet. Die angezeigte Temperatur wich bei 20° C (Temperaturanzeige) um $4,1^\circ$ von der Rotortemperatur ab. Bei 37° C betrug die Temperaturdifferenz, um die der Rotor wärmer war, nur noch $1,8^\circ$. Ich habe die Rotortemperatur unmittelbar nach dem Lauf mit einem vorgewärmten Mikrothermometer in der Zelle gemessen und diese Temperatur den Berechnungen zugrunde gelegt. Ich bin mir der Unsicherheit dieses Verfahrens bewußt, da hierbei weder die beim Abbremsen entstehende Wärme aus der adiabatischen Kompression des Rotors noch ein eventueller Wärmeverlust an die kältere Kühlspirale während der Auslaufzeit (etwa 5 min) berücksichtigt werden. Es wurden deshalb Parallelläufe in einer Spinco-Ultrazentrifuge Modell E der Firma Beckman-Instruments am gleichen Tag mit genau gleichen Lösungen gefahren. Die Übereinstimmung der ermittelten Sedimentationskonstanten war sehr gut und zeigte, daß unsere nach dem Lauf gemessenen Temperaturen nur um maximal $0,3^\circ$ von den während des Laufes direkt im Rotor der Beckman-Maschine gemessenen Temperaturen abwichen. Weitere Versuche an unserer Maschine zeigten, daß die Temperatur im Rotor 30 min nach den Anfahren konstant ist, was für unsere Läufe, die etwa 5 Stunden dauerten, ausreichte.

Die mit der Phasenplatte erhaltenen dn/dx nach x-Diagramme (s. Diffusion) wurden auf Kodak TriX, Belichtung 20 sec, aufgenommen und 8 min in Metol-Hydrochinon 1:8 entwickelt.

Die Auswertung der Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe erfolgte in der normalen Art³⁵⁾ nach der Gleichung

$$s = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{\Delta \ln x}{\Delta t} \quad (5)$$

Darin bedeuten s den Sedimentationskoeffizient, ω die Winkelgeschwindigkeit und x den Abstand des Maximums der Gradientenkurve (Peak) vom Rotationszentrum. Die gemessenen Sedimentationskoeffizienten wurden durch Multiplikation mit dem Ausdruck

$$\frac{(1 - \bar{v} \rho)_{20, W}}{(1 - \bar{v} \rho)_{T, P}} \cdot \frac{\eta_{T, W}}{\eta_{20, W}} \cdot \frac{\eta_{20, P}}{\eta_{20, W}} \quad (6)$$

auf Standardbedingungen (20° C, Wasser) umgerechnet. Darin bedeuten $\bar{v}$ das Partialvolumen des Proteins in ml/g, und ρ die Dichte des Lösungsmittels. Die Indices 20, T, P und W deuten an, daß die entsprechenden Größen für 20° C, T° C, Puffer und Wasser gelten.

II.9 Partialvolumen

Die Messung des Partialvolumens $\bar{v}$ für natives Tropokollagen ist wegen der außerordentlich hohen Viskosität sehr schwer³⁶⁾. Für die Berechnungen dieser Arbeit wurde ohne eigene Messungen der wahrscheinlichste Literaturwert (s. Tab. I) für das native Tropokollagen $\bar{v} = 0,73$ ml/g und für das denaturierte ein Wert von 0,70 angenommen.

II.10 Lichtstreuung

Ich benutzte das Streulichtphotometer nach Cantow der Firma Netheler und Hinz, Hamburg. Das Gerät mißt die Streuintensität relativ zu einem Streustandard; die Winkelabhängigkeit der Streuintensität kann in einem Bereich von 30 - 150° gemessen werden. Wenn nicht anders erwähnt, wurde zur Messung der absoluten Streuintensität bei 90° unpolarisiertes und zur Messung der Winkelabhängigkeit vertikal polarisiertes

Primärlicht der Wellenlänge $\lambda = 436 \text{ m}/\mu$ gewählt. Die Temperatur wurde in der Zelle gemessen und konnte auf $\pm 0,1^\circ$ konstant gehalten werden. Die Aufheizzeit von Zimmertemperatur auf etwa 35° betrug etwa 10 min.

Die Eichung des Standards erfolgte mit vierfach destilliertem Benzol unter Zugrundelegung des wahrscheinlichsten Wertes von dessen 90° -Streuung: $R_{436 \text{ m}/\mu}^{436 \text{ m}/\mu} = 48,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ und $R_{546 \text{ m}/\mu}^{546 \text{ m}/\mu} = 16,3 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^{-1}$ ³⁷⁾. Dabei und bei allen folgenden Messungen wurde die Korrektur nach Hermans und Levinson ³⁸⁾ angewendet, d.h. die gemessenen Intensitäten wurden mit dem Quadrat des Brechungsindex des Lösungsmittels multipliziert. Zur Kontrolle der Eichung wurden die Verhältnisse der Streuintensitäten von vierfach destilliertem Wasser bzw. Methanol zu Benzol mit den besten Literaturwerten ³⁷⁾ verglichen:

	gefunden	Literatur
$R_{\text{Wasser}}/R_{\text{Benzol}}$	0,079	0,089
$R_{\text{Methanol}}/R_{\text{Benzol}}$	0,167	0,170

Außerdem wurde ein Polyäthylenglykol, welches mir als Testsubstanz vom Institut für Chem. Technologie der Techn. Hochschule München zur Verfügung gestellt wurde, vermessen:

	von uns gefunden	Techn. Hochschule
M_w	7150	7270

Da die Lichtstreuung von Molekülen, verglichen mit der Streuung, die bereits durch kleinste Mengen an Schwebeteilchen (z.B. Staub) hervorgerufen wird, gering ist, besteht ein nicht immer leicht zu lösendes Problem in der Reinigung der Lösungen bis zur absoluten optischen Klarheit.

Zur Reinigung der nativen Tropokollagenlösungen wurde über Nacht bei 26000 g zentrifugiert. Das Füllen der Zelle erfolgte mit einer feuchten Pipette, die sehr langsam gefüllt und entleert wurde (Gummiball). Bei schneller Strömung bilden sich, besonders an trockenen Glasoberflächen, feine Flöckchen. Mit

dieser Methode konnten Lösungen unter 0,025 g/100 ml optisch klar erhalten werden. Die Klärung der denaturierten Lösungen erfolgte ohne besondere Schwierigkeiten mit Hilfe einer Druckfiltration durch Glasfritten vom Typ G 5 der Firma Schott, Mainz, bei 40° C. Zur Prüfung auf Schwebeteilchen diente eine unter spitzen Winkel zum Primärstrahl gestellte Spaltlupe. Nur Lösungen, in denen mit diesem Instrument keine Schwebeteilchen mehr entdeckt werden konnten - diese erscheinen als kleine, leuchtende Punkte - wurden vermessen.

II.11 Temperaturmessung

Wegen der extremen Temperaturabhängigkeit der Denaturierungskinetik wurden alle Temperaturen mit dem gleichen Eichthermometer (1/10 Teilung) gemessen. Zur Temperaturmessung in den Zellen der optischen Drehung und Lichtstreuung diente ein temperaturabhängiger Hartglas-Platinwiderstand in Verbindung mit einer von mir selbstgebauten Wheatstone'schen Brücke. Die erreichte Genauigkeit war $\pm 0,05^{\circ}$ C.

II.12 Berechnung der molekularen Größen

Zur Bestimmung des Molekulargewichts, der Form und Abmessungen eines Makromoleküls in Lösungen müssen aus theoretischen Gründen meist mehrere der primär gemessenen Größen (Sedimentationskonstante, Diffusionskonstante, Viskositätszahl usw.) miteinander kombiniert werden. Außerdem ist es nötig, möglichst viele unabhängige Methoden zur Bestimmung einer Größe heranzuziehen, da die Fehleranfälligkeit der Meßmethoden sehr verschieden ist. So wird die Intensität des Streulichtes besonders bei kleinen Winkeln durch mikroskopische Schwebestoffe stark erhöht, so daß die Methode der Lichtstreuung in Gegenwart dieser, die anderen Methoden kaum beeinflussenden, Verunreinigungen um Größenordnungen zu hohe Molekulargewichte liefert. Umgekehrt wird die Diffusionskonstante bei Verunreinigung des Proteins mit niedermolekularen Stoffen zu hoch gefunden, wodurch ein zu niedriges Molekulargewicht vorgetäuscht wird.

Im Falle einer Mischung von Molekülen mit verschiedenem Molekulargewicht erhält man mit den verschiedenen Methoden verschiedene Mittelwerte, von denen das Zahlen- und Gewichtsmittel (M_n und M_w) die wichtigsten sind:

$$M_n = \frac{\sum n_i M_i}{\sum n_i} = \frac{\sum c_i}{\sum \frac{c_i}{n_i}} ; \quad M_w = \frac{\sum n_i M_i^2}{\sum n_i M_i} = \frac{\sum c_i M_i}{\sum c_i} \quad (7)$$

n_i : Menge der Komponente i mit dem Molekulargewicht M_i in Mol

c_i : Konzentration der Komponente i in g/100 ml;

Ist der gemessene Effekt nur von der Teilchenzahl abhängig (Osmose, Kryoskopie usw.), so erhält man M_n , ist er der Konzentration und dem Molekulargewicht der Einzelmoleküle proportional (Lichtstreuung, Viskosität), so wird M_w erhalten. Auch komplizierte, gemischte Mittel sind möglich (Molekulargewicht aus Sedimentation und Diffusion). Für die Parameter der Gestalt (Achsenverhältnis, Länge usw.) werden sinngemäß ähnliche Mittelwerte erhalten. Aus dem Vergleich der verschiedenen Mittelwerte kann man Schlüsse auf die Molekulargewichtsverteilung ziehen, die sich entweder stetig über einen gewissen Bereich erstrecken kann (Polymolekularität) oder aus wenigen Molekülararten mit bestimmtem Molekulargewicht besteht (Paucimolekularität).

Die klassische Methode zur Berechnung des Molekulargewichtes von hochmolekularen Stoffen ist die nach Svedberg³⁵⁾ aus der Sedimentationskonstante und der Diffusionskonstante:

$$M = \frac{s^0 k N T}{D^0 (1 - \bar{v} \rho)} \quad (8)$$

k: Boltzmann'sche Konstante; N: Loschmidt'sche Zahl; T: Temperatur ($^{\circ}\text{K}$);

Die Sedimentations- und Diffusionskonstante (s^0 und D^0) werden durch Extrapolation der bei endlichen Konzentrationen gemessenen Sedimentations- bzw. Diffusionskoeffizienten (s^c und D^c) auf die Konzentration 0 bestimmt, womit der Einfluß intermolekularer Wechselwirkungen zwischen den Proteinmolekülen eliminiert wird.

Zur Extrapolation auf unendliche Verdünnung wurden die folgenden Gleichungen vorgeschlagen³⁵⁾:

$$s = s^0 (1 + k'_s c); \quad (9)$$

$$1/s = 1/s^0 (1 + k''_s c) \quad (10)$$

Dabei soll Gleichung 10 die Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten besonders gut für starre Stäbchen wiedergeben. Eine noch bessere Linearität bei stäbchenförmigen Molekülen soll nach theoretischen Erwägungen von Gehatia³⁹⁾ durch eine Auftragung von s gegen $c^{1/3}$ erreicht werden.

Aus den k -Werten können Rückschlüsse auf die Form der Moleküle gezogen werden. So ist $k'_s/[\eta] = 1,6 \cdot 10^{13} \text{ sec}^{-1}$ für statistische Knäuel. Für starrere Gebilde wurden niedrigere Werte (z.B. für Cellulosederivate $0,6 \cdot 10^{13} \text{ sec}^{-1}$ gefunden³⁶⁾).

Die Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten läßt sich meist gut durch die Gleichung 11 wiedergeben:

$$D = D^0 (1 + k'_d c) \quad (11)$$

Die Gleichung 8 ist unter der Bedingung abgeleitet, daß der Reibungskoeffizient f während der Diffusion gleich dem während der Sedimentation ist. Diese Bedingung ist nicht mehr erfüllt, sobald durch das Zentrifugalfeld eine Ausrichtung asymmetrischer Moleküle erfolgt. Schlüssige Beweise für eine solche Ausrichtung liegen bisher jedoch nicht vor. Die Gleichung 8 liefert unabhängig von den wahren Verhältnissen während der Untersuchung das Molekulargewicht des unsolvatisierten Moleküls, wenn das Partialvolumen $\bar{v}$ des unhydratisierten Moleküls eingesetzt wird. Fehler von $\bar{v}$ gehen etwa dreifach in die Bestimmung des Molekulargewichtes ein.

Statt mit der Diffusionskonstante kann man nach Scheraga und Mandelkern⁴⁰⁾ die Sedimentationskonstante mit der Viskositätszahl $[\eta]$ kombinieren:

$$M = \left(\frac{N s^0 [\eta]^{1/3} \eta}{\beta (1 - \bar{v}_2)} \right)^{3/2} \quad (12)$$

Darin sind N die Loschmidt'sche Zahl und η die Viskosität des Lösungsmittels. Jedes Molekül beliebiger Abmessungen läßt sich in Lösung durch ein Rotationsellipsoid, welches die gleichen hydrodynamischen Eigenschaften hat, ersetzt denken. Der Formfaktor β wurde von Scheraga und Mandelkern in Abhängigkeit vom Achsenverhältnis a/b dieser hydrodynamischen Rotationsellipsoide tabelliert, die jedoch nur in speziellen Fällen den wirklichen Abmessungen des Moleküls näherungsweise gleichgesetzt werden können. Zur Anwendung dieser Methode zur Molekulargewichtsbestimmung muß demnach aus einer anderen Methode das Achsenverhältnis der hydrodynamischen Rotationsellipsoide bekannt sein.

Eine Abschätzung des Molekulargewichts aus der Viskosität allein gelingt mit Hilfe der Staudingergleichung:

$$[\eta] = k'_m M^q \quad (13)$$

wenn die empirischen Konstanten k'_m und q für eine Molekülgestalt bekannt sind. Die Gleichung gilt dann nur für eine "gestaltshomologe" Reihe. Für das statistische Knäuel ist $q = \text{ca. } 0,6 - 1,0$.

Williams et al.⁴¹⁾ gaben eine Abschätzung des Molekulargewichts allein aus der Sedimentationskonstante für Gelatinefraktionen an:

$$s = k''_m M^{0,5} + k'''_m \quad (14)$$

Eine unabhängige Bestimmung des Molekulargewichtes erlaubt die Methode der Lichtstreuung^{37,42)} nach der Gleichung

$$\frac{Kc}{R} = \frac{1}{M P_9} + \frac{2 B c}{kNT} + \frac{3 C c^2}{kNT} + \dots \quad (15)$$

mit

$$K = \frac{4 \pi^2 n^2}{\lambda^4} \left(\frac{dn}{dc} \right)^2 f_P$$

Darin bedeuten

- R Reduzierte Streustrahlung (bezogen auf Einheitsvolumen, Einheitsabstand und Primärintensität 1) in Abhängigkeit vom Beobachtungswinkel (cm^{-1}).
- ϑ Beobachtungswinkel zum Primärstrahl (s. Abb. 7)
- P_{ϑ} Streufunktion. Gibt für $c = 0$ den Faktor an, mit dem man das beim Winkel ϑ gemessene R dividieren muß, um $R_{\vartheta=0}$ zu erhalten.
- B, C 2. und 3. Virialkoeffizient des osmotischen Druckes.
- n Brechungsindex des Lösungsmittels
- f_p Korrektur für die Depolarisation des Streulichtes durch die Moleküle (ist bei Proteinen = ca. 1)
- N Loschmidt'sche Zahl
- k Boltzmann'sche Konstante

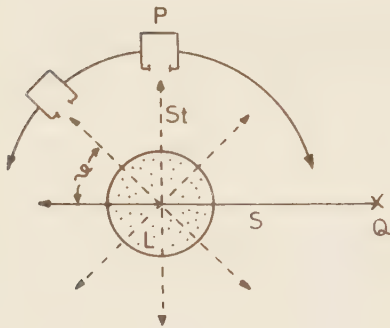


Abb. 7

Schema der Anordnung zur Messung der Lichtstreuung

- Q Quecksilberlampe
- S Primärstrahl
- L Lösung
- St Streulicht
- P Photomultiplier
- ϑ Beobachtungswinkel zum Primärstrahl

Bei Molekülen, deren Maximalabmessungen $\ll \lambda$ sind, ist $P_{\vartheta} = 1$ und $R = R_{\vartheta=0}$, d.h. die Streuintensität ist unabhängig vom Beobachtungswinkel. Man trägt in diesem Falle einfach Kc/R gegen c auf und erhält $1/M$ als Ordinatenabschnitt bei $c = 0$.

Für Moleküle mit Abmessungen $\gg \lambda$ tritt für alle Winkel $\vartheta \neq 0$ eine innermolekulare Interferenzauslöschung ein. In diesem Falle muß man außer auf unendliche Verdünnung auch noch auf $\vartheta = 0$ extrapolieren, da man aus experimentellen Gründen beim Beobachtungswinkel 0 nicht messen kann (s. Abb. 7).

$1/M$ ist der Ordinatenabschnitt, der auf $c = 0$ extrapolierten Winkelabhängigkeit von Kc/R bzw. der auf $\varphi = 0$ extrapolierten Konzentrationsabhängigkeit. Die Extrapolation auf $\varphi = 0$ geschieht am besten durch Auftragen von Kc/R gegen $\sin^2 \varphi/2$ ⁴³⁾ da sich hierbei für alle möglichen Molekülformen im Bereich kleiner Winkel eine Gerade ergibt.

Das zweite wichtige Problem ist die Bestimmung der Form und der Abmessungen der Moleküle in Lösungen. Die Methoden zur Formbestimmung in Lösungen liefern keine so exakten und anschaulichen Ergebnisse wie die Röntgenstrukturanalyse oder die Elektronenmikroskopie; ihr Vorteil liegt jedoch darin, daß das Molekül im gleichen Zustand untersucht wird, wie es im Organismus vorliegt. Im Prinzip vergleicht man bei all diesen Methoden immer das Verhalten der Moleküle mit dem angenommenen, idealisierter Formen wie Kugeln, Stäbchen, Rotationsellipsoiden usw., die nach theoretischen Überlegungen das jeweilige Molekül in seinen Eigenschaften ersetzen können. Es wird dann angenommen, daß die wahre Form des Moleküls von der des fiktiven Teilchens nicht allzu sehr abweicht.

Zur Bestimmung des Achsenverhältnisses a/b aus der Viskosität wird die von Einstein gefundene Beziehung

$$[\eta] \cdot 100 = \nu' \bar{\nu} \quad \text{mit} \quad \nu' = \nu \left(1 + \frac{w}{\bar{\nu} \varrho} \right) \quad (16)$$

benutzt. Darin sind ν das wahre und ν' das scheinbare Viskositätsinkrement und w ist die an 1 g Protein gebundene Menge Lösungsmittel in g mit der Dichte ϱ . Mehl et al.⁴⁴⁾ haben für Rotationsellipsoide verschiedener Achsenverhältnisse die ν -Werte theoretisch berechnet. Unsicher an dieser Methode ist der Solvatationsgrad w = die von 1 g Eiweiß gebundene Lösungsmittelmenge in g, der meist willkürlich als 0,3 angenommen wird. Bei Kenntnis von ν und M kann außerdem das Volumen des Rotationsellipsoids V_e berechnet werden

$$V_e = \frac{[\eta] M 100}{N \bar{\nu}} = \frac{4}{3} \pi a b^2 \quad (17)$$

Aus V_e und a/b lassen sich nach dieser Gleichung die Absolutwerte von a und b erhalten. Wird ein sehr langgestrecktes Rotationsellipsoid ($a/b > 20$) gefunden, so kann man annehmen, daß das Molekül in Wahrheit stäbchenförmig ist. Die Länge des Stäbchens (Zylinders) ist dann $l = 2 a$ und sein Durchmesser berechnet sich zu $d = \sqrt{2/3} b$.

Perrin⁴⁵⁾ berechnete in ähnlicher Weise die Achsenverhältnisse aus dem Verhältnis des wahren Reibungskoeffizienten

$$f = \frac{M (1 - \bar{v} \rho)}{N s} \quad (18)$$

zu dem theoretischen Reibungskoeffizienten f_0 eines gleichgroßen Moleküls mit kugelförmiger Gestalt

$$f_0 = 6 \pi \eta \sqrt[3]{\frac{3 M \bar{v}}{4 \pi N}} \quad (19)$$

Für die Charakterisierung von Molekülen mit der Form des statistischen Knäuels dienen hauptsächlich zwei Größen, die Wurzel des mittleren Quadrates des Trägheitsradius r_T (kurz Trägheitsradius genannt) und die Wurzel aus dem mittleren Quadrat des Fadenendenabstandes a_F (kurz mittlerer Fadenendenabstand). Letzterer läßt sich aus der Viskositätszahl von Lösungen statistischer Knäuel bestimmen

$$[\eta] = \phi \frac{a_F^3}{M} \quad \text{mit} \quad \phi = 1,7 - 2,2 \cdot 10^{21} \text{ 49)} \quad (20)$$

$$r_T \text{ ist mit } a_F \text{ verbunden durch} \quad r_T = \frac{a_F}{\sqrt{6}} \quad (21)$$

Große Bedeutung hat die Bestimmung der Molekülabmessungen aus der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung. Bezeichnet man als $\tan \alpha$ die Anfangsneigung der Auftragung von Kc/R gegen $\sin^2 \vartheta/2$ (s. Abb. 19 und 20), so gilt für beliebige Molekülformen

$$r_T = \frac{\sqrt{3}}{4 \pi n} \lambda \sqrt{M \tan \alpha} \quad (22)$$

wobei für Stäbchen $l = (\sqrt{3} / 6) r_T$ und für statistische Knäuel Gleichung 21 gilt.

Wie erwähnt, ist die Auftragung Kc/R gegen $\sin^2 \vartheta/2$ nur bei kleinen Winkeln linear; die weitere Form der Kurve wird von der Molekülgestalt bestimmt. Durch Auftragen von P_z^{-1} gegen eine von Peterlin^{46,47)} definierte Variable

$$v = \left(\frac{4\pi}{\lambda} r_T \right)^2 \sin^2 \frac{\vartheta}{2} = 3 \operatorname{tg} \alpha M \sin^2 \frac{\vartheta}{2} \quad (23)$$

wird erreicht, daß die Werte für Moleküle gleicher Gestalt und verschieden~~er~~ Abmessungen auf eine Kurve fallen. In dieser Arbeit interessieren nur die Gestalt des statistischen Knäuels und des starren Stäbchens zwischen denen aber viele Übergänge ausgehend vom idealen, völlig frei beweglichen statistischen Knäuel über Knäuel mit starren Bereichen und flexible Stäbchen bis zum starren Zylinder bestehen können. Peterlin definierte für diese Modelle eine Beharrungslänge a_b und berechnete für verschiedene $l/a_b = z$ Werte die theoretischen Kurven in der oben beschriebenen Auftragsart (Abb. 12). Durch Vergleich der experimentellen Kurven mit den theoretisch berechneten kann man den z -Wert bestimmen. Für $z = 0$ liegt ein völlig starres Stäbchen und für $z = \infty$ ein ideales statistisches Knäuel vor.

III. DAS NATIVE TROPOKOLLAGEN

III.1 Literaturergebnisse

Die wichtigsten Ergebnisse am Tropokollagen aus der Literatur sind (zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit) in Tabelle I (s. S. 31) zusammengefaßt. Dabei wurden die offensichtlich durch ungenügende Reinigung um Größenordnungen falschen, ersten Messungen mit der Lichtstreuung³¹⁾ weggelassen.

Auch die von Gallop²⁷⁾ (Reihe 1) erhaltenen Lichtstreuungswerte für Länge und Molekulargewicht dürften aus den gleichen Gründen zu hoch sein. Der Autor bestimmte durch Peterlinauftragung eine wirkliche Länge von 13400 Å und eine Beharrungslänge von 670 Å. Das Molekül wäre danach also nicht völlig starr.

Wahrscheinlichere Lichtstreuungsergebnisse am gleichen Material (Ichthyocol = Tropokollagen der Karpfenschwimmbase) erhielten Boedtker und Doty³⁶⁾ (Reihe 2). Allgemein kann gesagt werden, daß bei den Ergebnissen der Lichtstreuung immer die niedrigsten die wahrscheinlichsten sind.

Höhere Molekulargewichte und Abmessungen erhielt Noda⁴⁸⁾ (Reihe 3) am Rattenhauttropokollagen nach der Svedberggleichung und aus s und $[\eta]$. Die Diffusionskonstante wurde jedoch nur aus einer Messung ohne exakte Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit bestimmt. Außerdem wurde ein sehr hohes Partialvolumen $\bar{v}$ für die Berechnung der Molekulargewichte verwendet. Wird statt dessen $\bar{v} = 0,73$ zur Berechnung der Werte eingesetzt, so werden diese um 15 % niedriger.

Aus den gleichen Gründen erscheinen auch die Werte von Oreshowitsch und Schpikiter²⁰⁾ (Reihe 4) als etwas zu hoch.

Sorgfältig bestimmt erscheinen die Werte⁴⁹⁾ der Reihe 5 an Karpfenhaut, indessen die Werte von Fessler⁵⁰⁾ (Reihe 6) mit Ausnahme der Sedimentationskonstante schon aufgrund der Berechnungsart zweifelhaft erscheinen.

Tab. I.

Physikalische Daten an nativem Tropokollagen.

	Herkunft	Extraktion mit :	$s_{20,w}^0$ 10^{13} (sec)	$D_{20,w}^0$ 10^8 (cm ² /sec)	$\bar{V}$ (ml/g)	$-\alpha_D^{20}$ (°)	$[\eta]$ (100ml/g)	λ (Å) d (Å)	M 10^{-5}
	Literatur	Untersucht in :							
1	Karpfenschwimmbl. Gallop (27)	0.2m Citratp. pH 4.3 0.15m " pH 3.7	2.85	-	0.705	350	13.2	13400 (LS)	17 (LS)
2	" Boedtker, Doty (36)	0.15m " pH 3.7	2.96	-	0.700- 0.780	-	10- 13, 4	3000 (st, LS) 13.6 ([η])	2.5-3.4 (s, [η]) 3.5 (LS)
3	Rattenhaut Noda (48)	0.1 m " pH 4.6 Acetatp. $\mu=0.1$ pH 4.0	3.5	5(?)	0.78	-	15	5200 $\{f/f_0\}$ 14.7 (f/f ₀)	7.1 {D, s} 5.1 (s, [η])
4	Orechowitsch (20) Schpikiter	0.15m Citratp. pH 3.6 0.05m " pH 3.6	3.05- 3.25	3.5-4	0.75	-	16- 17.5	6700 ([η]) 12.8 ([η])	7.5 (s, D) 6 (s, [η])
5	Karpfenhaut Young, Lorimer (49)	0.1 m " pH 3.4	3.05 ±0.1	-	0.710	350	13.4	2800 ([η]) 13 ([η])	2.8 (s, [η])
6	Kaninchenhaut Fessler (50)	1/15m Phosphatp. pH 7 Acetatp. pH 3.7	2.76- 3.23	-	0.71	-	30 ?	3300 40	5.5-9.8 (s, [η])
7	Kalbshaut Doty, Nishihara (51)	0.15m Citratp. pH 3.7	3.02 3.28	-	0.73	408	13.5	3200 ([η], st) 13.5 ([η])	3.5 (s, [η]) 3.6 (LS)
8	Eigene Werte	0.4 m NaCl-LSG. 0.5 % Essigsäure. 0.15m Citratp. pH 3.7 untersucht in: 0.25m Citratp. pH 3.7	3.08	6.0	0.73	415	14.8	3200 ([η]) 2800 (LS) 12.7- ([η]) 15.3 ([η])	3.2-4.8 (LS) 3.4-3.5 (s, [η]) 4.6 (s, D) 3.3-3.6 (w, w)

Legenden siehe nächste Seite.

Erklärung der Symbole zu Tab. I:

- (LS) = mit der Lichtstreuungsmethode
(s, $[\eta]$) = aus Sedimentationskonstante und Viskositätszahl
(s, D) = aus Sedimentations- und Diffusionskonstante
($[\eta]$) = aus der Viskositätszahl berechnet
(St) = mit Strömungsdoppelbrechung
(f/f_0) = aus dem Reibungskoeffizienten
w.W. = wahrscheinlichste Werte

Erklärung der weiteren Symbole s. VII.

Doty und Nishihara⁵¹⁾ (Reihe 7) haben für Kalbshauttropokollagen gut übereinstimmende Werte mit verschiedenen Methoden erhalten. Sie haben allerdings die Diffusionskonstante nicht bestimmt und können deshalb kein Molekulargewicht aus s und D angeben.

Die Literaturwerte auch an gleichen Materialien sind nicht immer direkt miteinander vergleichbar, da der Einfluß der Unterschiede in der Aufarbeitung und im Puffersystem, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden, nicht bekannt ist. Obwohl die Werte der letztgenannten Autoren (Reihe 7) am verlässlichsten erschienen, habe ich die molekularen Daten an unserem Material mit allen bisher angewendeten Methoden (außer Strömungsdoppelbrechung) neu bestimmt, wobei außerdem der Einfluß verschiedener Extraktionsarten und Puffersysteme untersucht wurde.

III.2 Eigene Resultate und Diskussion

In Abb. 8 a, b und c sind die Sedimentationskoeffizienten von citratextrahiertem Tropokollagen aus Haut I (Bezeichnung Citr. I) und aus Haut II (Bezeichnung Citr. II) sowie von mit Essigsäure aus Haut II extrahiertem Material (HAc II) und von aus der gleichen Haut neutralextrahierten Tropokollagen (NaCl II) aufgetragen. Die Auftragung nach Gl. 10 (Abb. 8a) gibt, wie theoretisch für stäbchenförmige Moleküle vorausgesagt, eine bessere Linearität als die nach Gl. 9 (Abb. 8b). Nach beiden Auftragungen ist für die Messungen

in 0,25 m Citratpuffer $s_{20,w}^0 = 3,08 \cdot 10^{-13}$ sec. Die Auftragung nach Gehatia (Abb. 8 c) ergibt wie vorausgesagt (II,12) im ganzen Bereich eine Gerade, doch liegt $s_{20,w}^0 = 3,66 \cdot 10^{-13}$ sec dann erheblich höher. Diese Tatsache ist interessant, da es sich hier meines Wissens um die erste praktische Anwendung des Vorschlages von Gehatia handelt. Für die weiteren Berechnungen wurden die Extrapolationen nach den beiden gut durchgetesteten Gleichungen 9 und 10 als richtig angenommen.

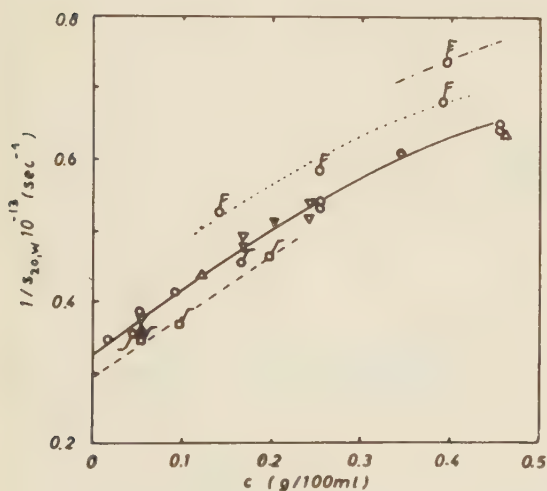


Abb. 8 a

Auftragung nach Gl. 10

Abb. 8 a, b, c

Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten von nativem Tropokollagen

$T = 20,0^\circ \text{C}$

- Citr. I
- Citr. II
- △ HAc II
- ▽ NaCl II

ohne Fähnchen: in 0,25 m Citratpuffer; $\mu = 0,2$;

mit Fähnchen: in 0,50 m Citratpuffer; $\mu = 0,4$;

Mit Doppelfähnchen: in 0,01 m Acetatpuffer; $\mu = 10^{-2}$;

Mit Dreifachfähnchen: in 0,0008 m Essigsäure; $\mu = 10^{-4}$;

Die nach den drei Extraktionsverfahren hergestellten und aus zwei verschiedenen Häuten stammenden Materialien zeigten ein völlig identisches Sedimentationsverhalten (s. Abb. 8a). Einen erheblichen Einfluß hat jedoch die Ionenstärke des Puffersystems. Dieses Verhalten kann sowohl durch die Ausbildung von Sedimentationspotentialen (diese werden jedoch im allgemeinen durch Zugabe eines Elektrolyten mit $\mu > 0,1$ "kurzgeschlossen") wie durch Formänderungen in Abhängigkeit von der Salzkonzentration erklärt werden.

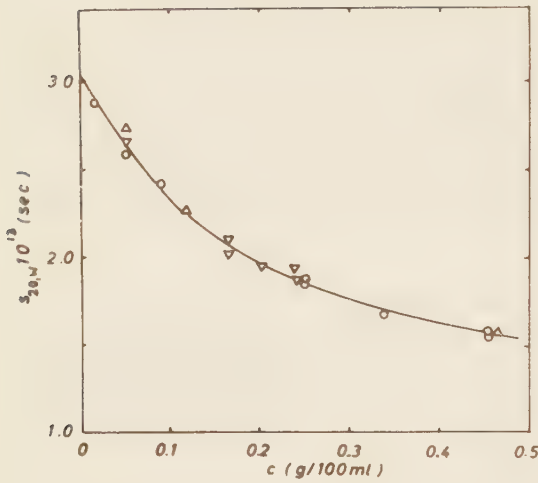


Abb. 8 b

Auftragung nach Gl.9

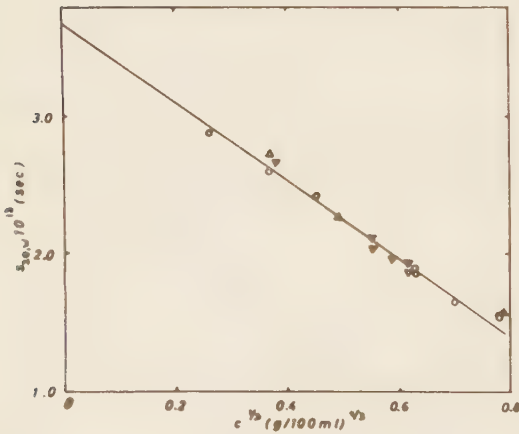


Abb. 8 c

Auftragung nach
Gehatia

Aus der Konzentrationsabhängigkeit der reziproken Sedimentationskoeffizienten (Abb. 8 a) berechnet sich $k''_s = 9 \cdot 10^{15}$ cm/sec g und mit der Viskositätszahl (s. unten) $k''_s / [\eta] = 0,61 \cdot 10^{13}$ 1/sec, ein Wert, der, wie erwähnt (s. II.12), für asymmetrische Moleküle charakteristisch ist.

Tabelle II

Diffusionskoeffizienten von nativem Tropokollagen der Kalbshaut

Material	Citratp. pH 3,7 m	c (g/100 ml)	$D_{20}^{25} 10^8$ (cm ² /sec)		$D_{20}^{25} 10^8$ (cm ² /sec)	
			Halbw.	Flächen	Halbw.	Flächen
Citr. I	0,25	0,077	4,92	5,03	5,50	5,64
+Citr. I	0,25	0,144	4,70	(6,10)	5,26	(6,84)
Citr. I	0,25	0,200	3,55	3,74	5,24	5,52
Citr. I	0,50	0,289	3,60	-	4,68	-
+Citr. I	0,25	0,380	3,58	(4,86)	4,02	(5,45)
Citr. II	0,25	0,124	4,66	-	5,16	-
NaCl II	0,25	0,247	4,60	-	5,10	-

+ Pufferkonz. nur dialytisch ausgeglichen;

Halbw.: Nach der Halbwertsbreitenmethode berechnet
Flächen: " " Flächenmethode "

Erklärung der weiteren Symbole s. VII

Die Tabelle II zeigt die nach den verschiedenen Auswerteverfahren bestimmten Diffusionskoeffizienten. Bei den Versuchen, in denen der Puffergradient nur dialytisch ausgeglichen worden war, fällt ein großer Unterschied zwischen den Ergebnissen der Halbwertsbreiten- und Flächenmethode auf, der bei vollständigem Ausgleich durch Wasserzugabe (s. II.7) fast völlig verschwindet. Für die Auftragung der Diffusionskoeffizienten gegen $c/2$ (Abb. 9) - im Mittel ist während der Diffusion ein Konzentrationsgefälle von $c/2$ wirksam - wurden die Resultate der Halbwertsbreitenmethode verwendet. Die durch Extrapolation auf $c = 0$ erhaltene Diffusionskonstante beträgt $6,0 \cdot 10^{-8}$ cm²/sec. Wegen der mühsamen Messung der Diffusionskoeffizienten (ein Versuch dauert eine Woche) wurden nur wenige Punkte von verschiedenen Materialien gemessen, doch scheint auch hier wie bei der Sedimentation keine Abhängigkeit vom Ausgangsmaterial und der Extraktionsart vorzuliegen.

Aus der in 0,25 m Citratpuffer gemessenen Sedimentations- und Diffusionskonstante sowie $\bar{v}$ (s. II.9) berechnet sich nach Gl. 8 das Molekulargewicht:

$s_{20,w}^0 10^{13} (\text{sec})$	$D_{20,w}^0 10^8 (\text{cm}^2/\text{sec})$	$\bar{v} (\text{ml./g})$	$M 10^{-5}$
3,08	6,0	0,73	4,6

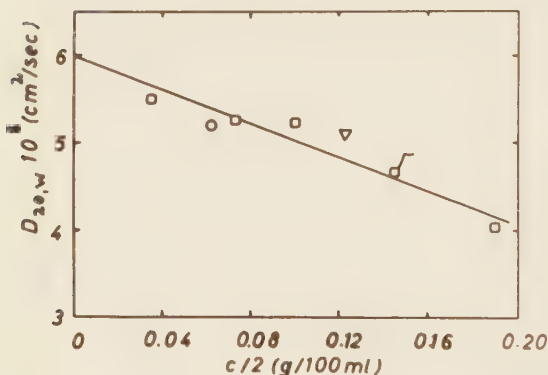


Abb. 9

Konzentrationsabhängigkeit der Diffusionskoeffizienten von nativem Tropokollagen

$T = 20,0^\circ \text{C}$

Bezeichnung der Punkte s. Abb. 8

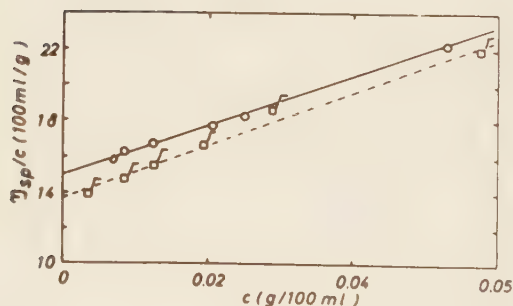


Abb. 10

Konzentrationsabhängigkeit der η_{sp}/c -Werte für natives Tropokollagen

$T = 20,0^\circ \text{C}$

Bezeichnung der Punkte s. Abb. 8

Die Extrapolation der η_{sp}/c Werte auf unendliche Verdünnung zur Bestimmung der Viskositätszahl $[\eta]$ zeigt Abb. 10 (der Übersicht halber nur für die am weitesten voneinander abweichenden Fälle). Wieder scheint ein Einfluß der Ionenstärke vorzuliegen. Aus der Viskositätszahl, der Sedimentationskonstanten und $\bar{v}$ kann nach Scheraga und Mandelkern (Gl. 12) das Molekulargewicht und nach Mehl et al (s. II.12) das Achsenverhältnis a/b bzw. die Abmessungen l und d der als Rotations-

ellipsoide bzw. Stäbchen angenommenen Moleküle berechnet werden (Gl. 16, 17). Um den Einfluß der Streuung der Viskositätszahlen und den Einfluß verschieden angenommener Hydratationsgrade abzuschätzen, wurden diese Berechnungen für die beiden Extremwerte von $[\eta]$ und für die Hydratationsgrade $w = 0$ und $w = 0,3$ durchgeführt (Tabelle III).

Tabelle III

Berechnung der Molekulargewichte und Moleküldimensionen aus $[\eta]$, s und $\bar{v}$.

	Natives Tropokollagen in			
	0,50 m Citratp.H 3,7		0,25 m Citratp.H 3,7	
$[\eta] (100 \frac{ml}{g})$	13,6		14,9	
$\eta_p 10^2 (\text{Poise})$	1,37		1,13	
$s_{20,p}^0 10^{13} (\text{sec})$	2,08		2,61	
Annahme:	$w = 0$	$w = 0,3$	$w = 0$	$w = 0,3$
$\bar{v}$	1920	1370	2100	1485
a/b aus $\bar{v}$	194	160	204	168
$\beta \cdot 10^{-6}$	3,47	3,39	3,49	3,41
$M 10^{-5}$	3,80	3,92	3,44	3,54
f/f_0	5,31	4,75	5,78	5,16
a/b aus f/f_0	165	135	203	158
$2a(\text{\AA})$ Ellip-	3400	3400	3160	3160
$2b(\text{\AA})$ soid	17,7	21,2	15,5	18,8
$l(\text{\AA})$ Stäb-	3400	3400	3160	3160
$d(\text{\AA})$ chen	14,3	17,3	12,7	15,3

Erklärung der Symbole s. VII

Außerdem wurden für die gleichen Fälle zur Kontrolle die Achsenverhältnisse aus den Reibungskoeffizienten nach Perrin (s. II.12) berechnet. Der Einfluß der verschiedenen Annahmen

zur Hydratation liegt innerhalb der Fehlergrenzen der Methode, doch ist ein geringer Einfluß der Ionenstärke auf die Form wahrscheinlich.

Die Methode der Lichtstreuung liefert, bedingt durch die besonderen Schwierigkeiten beim Tropokollagen (s. II.10) für das Molekulargewicht von $M = 3,2 \cdot 10^5$ bis $M = 4,8 \cdot 10^5$ streuende Werte (Abb. 11 a).

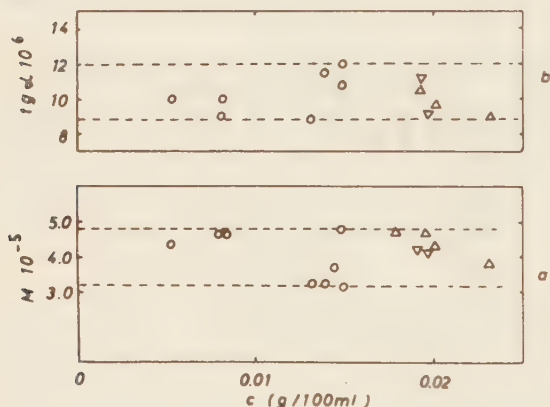


Abb. 11

Lichtstreuungs-
ergebnisse am
nativen Tropo-
kollagen

Auftragung gegen
die Konzentra-
tion.

a) Molekulargew. M

b) Anfangsneigung
der Winkelab-
hängigkeit der
Lichtstreuung
 $\text{tg} \alpha$

Bezeichnung der
Punkte s. Abb. 8

Entsprechend den Fehlermöglichkeiten dieser Methode (s. III.1) besitzen die kleineren Werte eine höhere Wahrscheinlichkeit. Eine Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren ist nicht nachweisbar. Die Virialkoeffizienten der Gl. 15 sind innerhalb der Fehlergrenzen 0, d.h. es ist keine Abhängigkeit von der Konzentration im Bereich der sehr niedrigen, untersuchten Konzentrationen nachweisbar. Das Gleiche gilt für die Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit des Streulichtes $\text{tg} \alpha$ die von $8,9 \cdot 10^{-6}$ bis $12 \cdot 10^{-6}$ schwankt (Abb. 11b). Noch mehr als beim Molekulargewicht sind hier die niedrigsten Werte vorzuziehen. Aus $\text{tg} \alpha = 9 \cdot 10^{-6}$ berechnet sich die Länge des Stäbchenmoleküls nach Gl. 22 zu $l = 2800 \text{ \AA}$. Zwei besonders gute Versuche (mit niedriger Winkelabhängigkeit) wurden der Analyse nach Peterlin (s. II.12) unterworfen (Abb. 12). Es zeigte sich, daß die Werte sehr gut auf der theoretischen Kurve für ein völlig starres Stäbchen ($z = 0$) liegen. Dieser

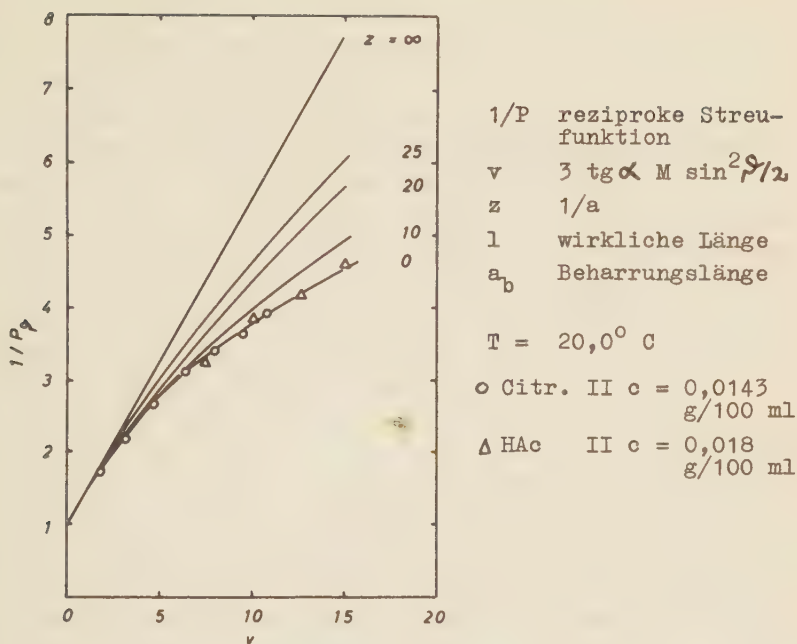


Abb. 12

Peterlin-Analyse der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung für natives Tropokollagen

Befund zeigt, im Gegensatz zu den älteren Angaben Gallops (s. Tab. I, Reihe 1), die aus bedeutend schlechteren Lichtstreuungsdaten gewonnen wurden, daß das Tropokollagenmolekül innerhalb der Nachweisgrenzen dieser Methode völlig starr ist.

III.3 Schlußdiskussion

Betrachtet man die in Tabelle I zusammengestellten molekularen Daten des nativen Tropokollagens, so finden wir die Werte von Doty und Nishihara im wesentlichen durch die eigenen Messungen bestätigt. Zieht man nur die niedrigsten Lichtstreuungswerte in Betracht, so erscheint das wahrscheinlichste Molekulargewicht $M = 3,3 \cdot 10^5$ bis $3,6 \cdot 10^5$ zu sein. Dafür spricht auch, daß durch Addition der Molekulargewichte der

bei der Denaturierung auftretenden Komponenten (s. IV.2) ein Wert von $3,3 \cdot 10^5$ erhalten wird und daß sich die Kinetik der 2. Stufe der Denaturierung mit diesem Wert besser darstellen läßt (s. V.3). Davon weicht nur das nach der Svedberggleichung bestimmte Molekulargewicht wesentlich ab, was entweder durch die Unsicherheit in der Bestimmung der Diffusionskonstanten oder durch die unerlaubte Gleichsetzung der Reibungskoeffizienten aus Sedimentation und Diffusion (s. II.12) erklärt werden kann. Als wahrscheinlichste Dimensionen erscheinen $l = 2800 - 3200 \text{ \AA}$ und $d = 13,5 \text{ \AA}$. Als zusätzliches Ergebnis wurde gewonnen, daß die molekularen Daten von neutral- und nach zwei Methoden sauer extrahiertem Material sowie des sauerextrahierten Materials aus zwei verschiedenen Häuten identisch sind.

Beim kritischen Vergleich der übrigen Daten der Tabelle I erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß überhaupt die Molekulargewichte und Abmessungen aller bisher untersuchten Kollagenarten annähernd gleich sind. Dafür spricht, daß die direkt und ohne große Fehlermöglichkeiten meßbaren Größen s und $[\eta]$ bei allen Untersuchern gut übereinstimmen. Sichere Unterschiede bestehen nur in den Daten, die von der unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung beeinflusst werden, wie der optischen Drehung und Denaturierungstemperatur⁵²⁾.

IV. DAS DENATURIERTE TROPOKOLLAGEN

IV.1 Literaturergebnisse

Noch widerspruchsvoller als beim nativen sind die in der Literatur angegebenen Daten beim denaturierten Tropokollagen (s. Tab. IV). Die Untersuchungsbedingungen unterscheiden sich noch stärker. So wurde, um die Renaturierung zu vermeiden, von einem Teil der Untersucher in Gegenwart von hohen Konzentrationen wasserstoffbrückensprengender Agenzien (KCNS, Harnstoff) gearbeitet (Reihe 2, 3, 4 und 7); andere arbeiteten bei höheren Temperaturen (ca. 40° C) (Reihe 6 und 8).

Als erste haben Orechowitsch und Schpikiter^{20,53)} (Reihe 4) gefunden, daß das sauer extrahierte denaturierte Tropokollagen der Rattenhaut sich in der Ultrazentrifuge in zwei Komponenten trennt, von denen sie die langsamer sedimentierende α - und die schnellere β nannten. Da der Johnston-Ogston Effekt³⁵⁾ die langsamer sedimentierende Komponente größer und die schnellere kleiner erscheinen läßt, ist eine direkte Berechnung der Gewichts- bzw. Molverhältnisse aus den Flächen nur möglich, wenn man die gemessenen Flächenverhältnisse auf unendliche Verdünnung extrapoliert, bei der der Effekt verschwindet. Die russischen Autoren haben auf diese exakte Methode verzichtet und nur durch Zugabe von bekannten Mengen einer isolierten α -Komponente den Effekt abzuschätzen versucht. In einer neueren Arbeit¹⁹⁾ fanden die Autoren, daß in neutral extrahiertem Rattenhauttropokollagen nur die α -Komponente neben sehr wenig β vorliegt.

Gallop²⁷⁾ (Reihe 1) fand auch am sauer extrahierten Ichthyocol keine Auftrennung in die Komponenten, indessen Boedtker und Doty³⁶⁾ (Reihe 2) aus dem Verhältnis M_w/M_n auf mindestens zwei Komponenten mit verschiedenen Molekulargewichten schlossen und Chun und Doty⁵⁴⁾ (Reihe 3) die zwei Komponenten durch fraktionierte Alkoholfällung trennten.

Auch an Karpfenhaut konnten in der Ultrazentrifuge beide Komponenten nachgewiesen werden⁵⁵⁾ (Reihe 5).

Tab. IV.

Physikalische Daten an denaturiertem Tropokollagen.

Herkunft Literatur	Extraktion mit: Untersucht in:	$[\alpha]_D^{40}$	Mischung $M_w 10^{-5}$ $M_n 10^{-5}$	α -Komp. $M 10^{-5}$	β -Komp. $M 10^{-5}$	γ -Komp. $M 10^{-5}$	Molverh. $\alpha:\beta:\gamma$
1 Karpfenschwimmbl. Gallop (27)	0.2 m Citratp. pH4.3 0.15m " pH3.7	110	0.7 (LS)	0.7 (Os)	-	-	-
2 " " " " " " " "	0.15m " pH3.7 +KCNS	-	1.43 (LS)	1.25 (Os)	-	-	-
3 Chun u Doty (54)	0.15m " pH3.7 +KCNS	-	-	0.8 (w)	1.6 (w)	-	2:1 (?)
4 Rattenhaut Orechowitsch u. Schpikiter (20,53)	0.15m " pH3.4 Phosphatp. pH8+KCNS	-	-	1.3 (sD)	2.8 (s,D)	-	2:1 (Sch)
5 Karpfenhaut Young, Lorimer (55)	0.1 m Citratp. pH3.4	-	-	1.1 (w)	2.1 (w)	-	2:1 (Sch)
6 Kalbshaut Piez et al. (29)	3 % Essigsäure 0.15m Acetatp. pH4.8 38°C	-	-	0.8 (w)	1.6 (w)	-	2:1 (Asr)
7 " " " " " " " "	0.15m Citratp. pH4.8 +KCNS	135	1.95 (LS)	1.7 (Os)	2.3 (w)	-	1:1 (M/Mn)
8 " " " " " " " "	0.4 m NaCl-Lösung 0.15m Citratp. pH3.7 0.5 % Essigsäure untersucht in: 30°C 0.25m Citratp. pH3.7	135	1.4 (LS) 1.9 (LS)	-	1.15±10% (w) 2.15±10% (w)	2.9±15% (w)	fast nur α 1:1:1/13 (E1)

Legenden siehe nächste Seite.

Erklärung der Symbole zu vorstehender Tabelle:

- (LS) mit der Lichtstreuungsmethode
(Os) aus osmotischen Messungen
(s,D) aus Sedimentations- und Diffusionskonstante
(W) nach Williams et al.⁴¹⁾ aus der Sedimentationskonstante allein abgeschätzt
(Sch) geschätzter Wert
(Asr) aus den Unterschieden in der Aminosäureanalyse
(M_w/M_n) aus dem Verhältnis von M_w zu M_n
(El) durch Eliminierung des Johnston-Ogston Effektes
- Erklärung der weiteren Symbole s. VII.

Die beiden Untersuchungen am Kalbshauttropokollagen^{29,18)} (Reihe 6 und 7) zeigen gleichfalls sehr unterschiedliche Ergebnisse. Hierbei sind wieder die Ergebnisse von Doty und Nishihara¹⁸⁾ (Reihe 7) die wahrscheinlichsten, da sie auf einer großen Anzahl unabhängiger Messungen beruhen. Das Molverhältnis wurde von diesen Autoren aus dem Verhältnis M_w/M_n berechnet, indessen es Piez et al.²⁹⁾ aus den mit großen Meßgenauigkeiten behafteten Unterschieden in der Aminosäurezusammensetzung der, von ihnen teilweise getrennten, Komponenten berechneten. In einer anderen Arbeit⁵⁶⁾ konnten Piez et al. durch Trennung des denaturierten Tropokollagens der Rattenhaut an CM-Cellulose zeigen, daß die α - und β -Komponente mindestens noch aus je zwei im Molekulargewicht identischen, jedoch chemisch verschiedenen Komponenten (α_1, α_2 und β_1, β_2) bestehen, wobei sich die Molverhältnisse von Gesamt- α zu Gesamt- β wie 2:1 verhalten. Die Autoren konnten außerdem zeigen, daß dieses Verhältnis bei lathyritischen Ratten (Lathyrismus = durch Genuß der Platterbse hervorgerufene pellagraähnliche Erkrankung) zugunsten der α -Komponente verschoben ist⁵⁷⁾.

Bei der Bestimmung der Molekulargewichte wurde von allen Untersuchern bis auf Orechowitsch und Schpikiter die Abschätzung nach Williams et al.⁴¹⁾ (s. II.12) angewendet. Die gefundenen Unterschiede in den Molekulargewichten beruhen deshalb allein auf Unterschieden in den Sedimentationskonstanten, die allerdings mit verschiedener Genauigkeit auf unendliche Verdünnung extrapoliert wurden.

IV.2 Eigene Resultate und Diskussion

Die Ultrazentrifugenuntersuchungen wurden zur Verhinderung der Renaturierung bei $38 - 40^{\circ} \text{C}$ durchgeführt und die Proben vor der Untersuchung 30 Min. bei 40°C denaturiert. Abb. 13 zeigt eine typische Auftrennung bei zwei verschiedenen Konzentrationen. Die durch die Sedimentation des Puffers entstehende Durchbiegung der Basislinie, die im gleichen Lauf mit einer zweiten Zelle bestimmt worden war, ist in Abb. 13

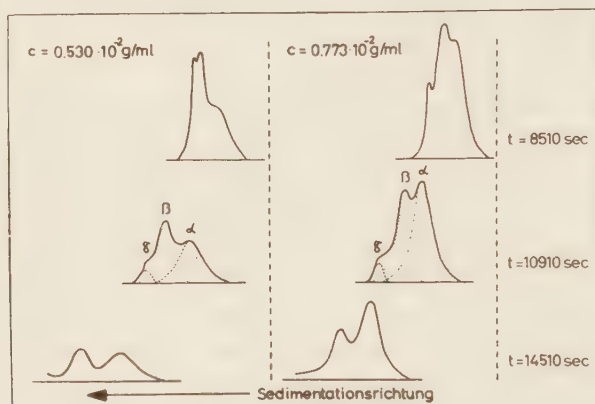


Abb. 13

Auftrennung von sauer extrahiertem und vollständig denaturiertem Tropokollagen (HAc II) in der Ultrazentrifuge

$T = 38,7^{\circ} \text{C}$; Messung in 0,25 m Citratpuffer; pH 3,7;

Die Zeit t rechnet vom Erreichen der vollen Drehzahl von 51460 U/Min.

Die gestrichelten Linien rechts von den Bildern sind Referenzlinien mit 6,20 cm Abstand vom Rotationszentrum.

Die Durchbiegung der Basislinie (Puffersedimentation) wurde eliminiert.

bereits abgezogen. Das Auftreten einer dritten, schneller sedimentierenden " γ -Komponente" wurde sowohl bei dem mit Citratpuffer (Citr. I und Citr. II) als auch bei dem mit Essigsäure extrahierten Material (HAc II) beobachtet. Das lösliche Kollagen aus zwei verschiedenen Häuten (I und II) erwies sich dabei als völlig identisch. Die γ -Komponente ist sicher

keine Verunreinigung, da sie durch ihre hohe Sedimentationskonstante sonst bereits bei der Sedimentation des nativen Materials in Erscheinung treten müßte.

Die Abb. 14 zeigt die Extrapolation der Sedimentationskonstanten auf die Konzentration Null.

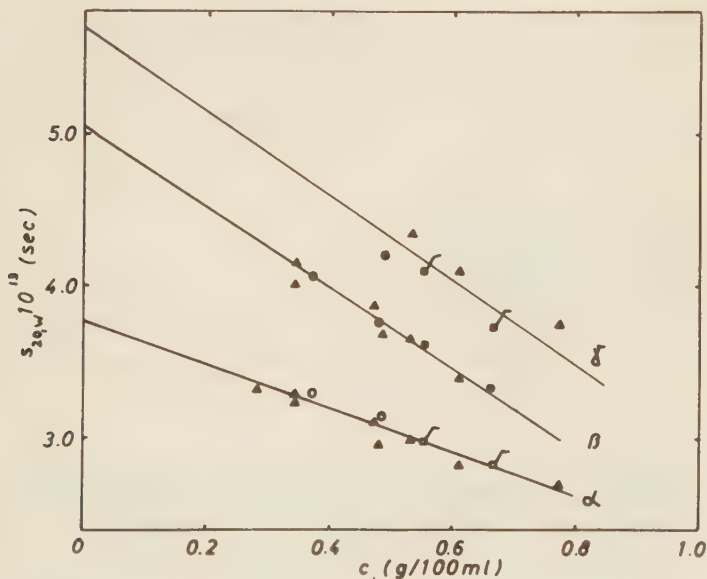


Abb. 14

Extrapolation der Sedimentationskoeffizienten der Komponenten α , β und γ auf die Konzentration Null

Material und Puffer, sowie Bezeichnung der Punkte s. Abb. 8

Die gute Auflösung und der lange Sedimentationsweg (15 mm) unserer Zentrifuge erlaubten es für etwa 10 Aufnahmen jedes einzelnen Laufes bei Konzentrationen von 0,25 - 0,8 % die Gradientenkurven zu konstruieren. Der durch die Sektorform der Zellen bedingte Verdünnungseffekt wurde durch Multiplikation der planimetrierten Flächen mit x_t^2/x_m^2 (x_t = Abstand Rotationszentrum - Maximum des Peaks zur Zeit der Aufnahme, x_m = Abstand Rotationszentrum - Meniskus) eliminiert. Zur exakten

Eliminierung des Johnston-Ogston Effektes sind in Abb. 15 die so erhaltenen Verhältnisse der Einzelflächen F_i zur Gesamtfläche $\sum F_i$ auf die Gesamtfläche gleich Null extrapoliert.

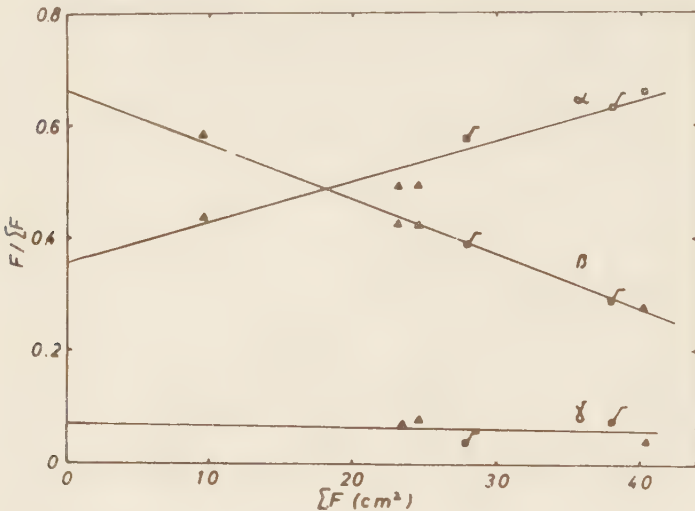


Abb. 15

Extrapolation der Verhältnisse der Einzelflächen F_i zur Gesamtfläche $\sum F_i$ auf die Gesamtfläche Null zur Eliminierung des Johnston-Orgston Effektes

Meßpunkte s. Abb. 8

Aus den so erhaltenen wahren Flächenverhältnissen der Komponenten lassen sich die Gewichtsprozent und daraus mit Hilfe der aus den Sedimentationskonstanten bestimmten Molekulargewichte die Molprozent berechnen:

Komponente	$s_{20,w}^0 \cdot 10^{13} (\text{sec.})$	$M \cdot 10^{-5}$	Gew.-%	Mol.-%
α	3,8	$1,15 \pm 10\%$	32,8	48,4
β	5,05	$2,15 \pm 10\%$	60,7	47,9
γ	5,7	$2,9 \pm 15\%$	6,4	3,7

Die Molverhältnisse verhalten sich wie 1:1, womit die Annahme von Doty und Nishihara (s.Tab. IV) bestätigt wird, derzufolge das Tropokollagenmolekül in eine Einzel- und eine Doppelkette zerfällt. Gewichts- und Zahlenmittel des Molekular-

gewichts berechnen sich aus den obigen Werten zu $1,87 \cdot 10^5$ und $1,7 \cdot 10^5$ in guter Übereinstimmung mit den durch Lichtstreuung bzw. Osmose gemessenen Werten der amerikanischen Autoren von $1,95 \cdot 10^5$ und $1,7 \cdot 10^5$ und unserem mit der Lichtstreuung gemessenen Wert für das Gewichtsmittel von $1,9 \cdot 10^5$ (s. unten).

Im denaturierten, neutralextrahierten Tropokollagen (NaCl II) wurde im Einklang mit den Ergebnissen von Orechowitsch und Schpikiter an Rattenhaut¹²⁾ in der Ultrazentrifuge sehr wenig β neben viel α gefunden (Abb. 16).

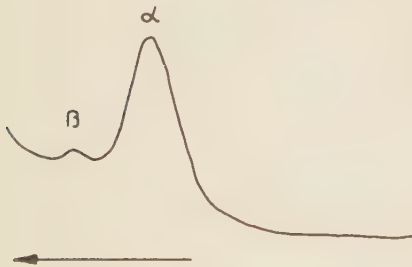


Abb. 16

Auftrennung von neutral-extrahiertem und vollständig denaturiertem Tropokollagen (NaCl II) in der Ultrazentrifuge

$T = 38,2^\circ\text{C}$; $c = 0,715$ g/100 ml in 0,25 m Citr. puffer; $t = 16320$ sec.

Die Puffersedimentation (Durchbiegung der Basislinie) wurde nicht eliminiert.

Übrige Angaben s. Abb.13

Die Viskositätszahl des sauerextrahierten, denaturierten Tropokollagens wurde zu 0,60 100 ml/g bestimmt. Daraus errechnen sich nach Gl. 20 mit $\phi = (1,7 - 2,2) \cdot 10^{21}$ der mittlere Fadenendenabstand und der Trägheitsradius zu $a_F = 372 - 405 \text{ \AA}$ und $r_T = 152 - 166 \text{ \AA}$.

Mit der Methode der Lichtstreuung wurde das Gewichtsmittel des Molekulargewichts von denaturiertem Citr. I und HAc II zu $1,9 \cdot 10^5$ und von NaCl II zu $1,4 \cdot 10^5$ bestimmt (Abb. 17 a). Der Unterschied zwischen den sauer- und neutralextrahierten Material steht in guter Übereinstimmung mit den Ultrazentrifugenuntersuchungen (s. dort). Die Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit ist etwas konzentrationsabhängig (Abb. 17 b). Der extrapolierte Wert beträgt $\text{tg} \alpha = 0,5 \cdot 10^{-6}$. Daraus berechnen sich die folgenden Mittelwerte der Dimensionen des statistischen Knäuels:

- a) für sauerextrahiertes Tropokollagen: $a_F = 340 \text{ \AA}$;
und $r_T = 139 \text{ \AA}$;
b) für neutraleextrahiertes Tropokollagen: $a_F = 290 \text{ \AA}$;
und $r_T = 120 \text{ \AA}$;

Diese Ergebnisse stimmen mit nur 15 % Abweichung mit denen aus der Viskosität überein (s. dort).

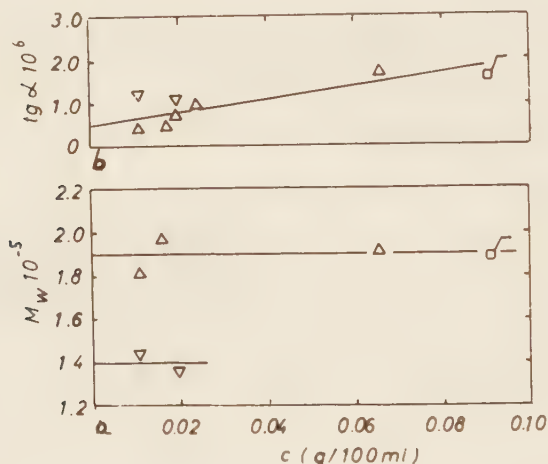


Abb. 17

Lichtstreuungsergebnisse an vollständig denaturiertem Tropokollagen

Auftragung gegen die Konzentration; $T = 38^\circ \text{ C}$;

a) Gewichtsmittel des Molekulargewichts M_w ;

b) Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit $\text{tg } \alpha$;

Punkte wie in Abb. 8

IV.3 Schlußdiskussion

Vergleicht man in Tab. IV meine Ergebnisse mit denen der Literatur, so ist auffällig, daß wie in Tab. I die Daten von Doty und Nishihara gut bestätigt werden. Dieses könnte dadurch erklärt werden, daß diese Autoren zufällig ein sehr ähnliches Material in der Hand gehabt haben. Es ist aber trotzdem zu vermuten, daß wie beim nativen Material die Unterschiede in den Molekulargewichten für die α - und β -Kom-

ponente verschiedener Materialien zum größten Teil auf Meßfehlern beruhen. Ich nehme die von mir gefundenen Molekulargewichte als die wahrscheinlichsten an, da die zugrundeliegende Sedimentationskonstante aus einer weit größeren Menge an Punkten als bisher bestimmt wurde und außerdem durch Addition recht gut das Molekulargewicht des nativen Materials erhalten wird.

Die γ -Komponente wurde unabhängig von mir etwa zur gleichen Zeit von Altgelt et al.⁵⁸⁾ als Hauptbestandteil von aus renaturierten Tropokollagenlösungen ausgefällten Long spacing Segmenten gefunden ($s_{20,w} = 5,0 \cdot 10^{-13}$ sec und $M = 3,2 \cdot 10^5$). Ich fand diese in ihrem Renaturierungsverhalten sehr interessante Komponente (s. VI.3) dank der höheren optischen Auflösung unserer Zentrifuge im ursprünglichen, denaturierten Tropokollagen. Sie ist außerdem wahrscheinlich identisch mit der " γ -Komponente" von Veis et al.⁵⁹⁾, die auf völlig andere Art in einer auf sehr milde Art gewonnenen Gelatine (Extraktion von Haut mit isoionischem Puffer, pH 6,6 bei 60°) gefunden wurde.

Zur Erklärung der γ -Komponente könnte man sich in Weiterentwicklung der Modellvorstellungen von Doty und Nishihara¹⁸⁾ vorstellen, daß der Grundbaustein des löslichen Kollagens die α -Komponente mit einem Molekulargewicht von $1,15 \cdot 10^5$ ist, welche im nativen Molekül eine Helix der übergeordneten Dreierspirale des Modells von Rich und Crick¹¹⁾ bildet (s. Abb. 18).

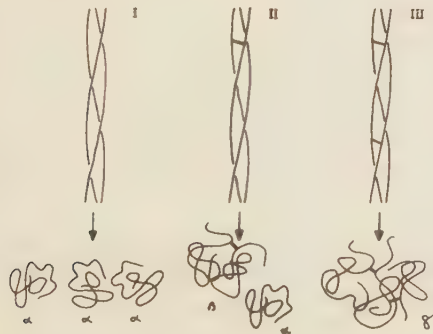


Abb. 18

Modellvorstellung der Denaturierung von Tropokollagen

Nicht maßstäblich; Erklärung s. Text

Das native Molekül könnte im Organismus zunächst aus drei α -Komponenten gebildet werden (Fall I in Abb. 18), von denen später zwei durch eine Bindung verbrückt werden (Fall II). (Die drei Komponenten müssen in ihrer Aminosäurezusammensetzung und Sequenz nicht gleich sein^{56,60}). Bei etwa jedem 13. Molekül werden alle drei Helices verbunden (Fall III). Die so möglichen drei Molekülarten brauchen sich im nativen Zustand in ihren physikalischen Eigenschaften nicht zu unterscheiden; sie zerfallen bei der Denaturierung jedoch in verschieden große Produkte. Das Molekül I zerfällt in drei α -Komponenten, II in eine α - und eine β -Komponente und III in eine γ -Komponente. In dem von mir untersuchten, sauer-extrahierten Material müßte so neben der Molekülart II etwas von der Form III vorliegen. Durch diese Vorstellung wird gleichzeitig das neutral extrahierte Tropokollagen als ein Material erklärt, bei dem die Biosynthese noch nicht bis zur Verknüpfung der Komponenten fortgeschritten ist und welches überwiegend aus der Molekülform I besteht.

Obwohl die Molverhältnisse der Komponenten zueinander in den meisten Arbeiten (s. Tab. IV) nur ungenau bestimmt wurden, scheint es, daß auch beim sauer extrahierten Tropokollagen das Verhältnis der Komponenten keine materialunabhängige, konstante Größe ist. Dies wäre ebenfalls durch die Annahme eines Überganges $\alpha \rightarrow \beta \rightarrow \gamma$ im Zuge einer relativ langsamen Vernetzung, die außerdem noch durch Krankheiten gestört sein kann (s. IV.1), erklärbar. Andererseits ist bei einem Molverhältnis $\alpha : \beta = 1:1$ die kleinste Menge α vorhanden, mit der sich noch das übliche Kollagenmodell aufbauen läßt, in dem jeder α -Strang mit einem β -Strang verbunden sein muß. Deshalb erscheint das von mir und Doty und Nishihara gefundene Verhältnis ein Grenzwert zu sein, der im gesunden Organismus erreicht wird. Durch weitere Vernetzung kann auf Kosten der α -Komponente nur γ , nicht aber β gebildet werden.

Die aus der Lichtstreuung und Viskosität abgeleiteten mittleren Abmessungen der Komponenten deuten daraufhin, daß diese die Form statistischer Knäuel besitzen (s. I.3). Für eine

völlig ungeordnete Anordnung der Aminosäuren spricht auch, daß die optische Drehung des denaturierten Materials dem Mittelwert der im Tropokollagen enthaltenen Aminosäureresten entspricht¹⁸⁾.

V. DER DENATURIERUNGSVORGANG

V.1 Einführung und Literatur

Wie erwähnt (s. I.3) verläuft die Umwandlung des nativen Tropokollagens in den denaturierten Zustand oberhalb einer verhältnismäßig scharfen Temperaturschwelle mit rasch zunehmender Geschwindigkeit. Nach Doty und Nishihara¹⁸⁾ ist die Denaturierungstemperatur T_D für Tropokollagen als die Temperatur definiert, bei der die spezifische optische Drehung $[\alpha]$ bzw. die spezifische Viskosität η_{sp} innerhalb von 30 Min. um die Hälfte des Gesamtunterschiedes zwischen den entsprechenden Werten für den nativen und denaturierten Zustand abfällt. Die Denaturierungstemperatur ist abhängig von dem Gehalt an Iminosäuren⁵²⁾ und ist somit für die verschiedenen Kollagenarten verschieden (Kabeljauhautkollagen $T_D = 13^\circ \text{C}$; Kalbshautkollagen $T_D = 36^\circ \text{C}$). Qualitativ ist jedoch das Denaturierungsverhalten für alle Arten gleich.

Aus den bisher referierten Kenntnissen über den nativen und denaturierten Zustand des Tropokollagens (s. IV) können wir folgende Schlußfolgerungen auf den Denaturierungsvorgang ziehen:

1. Während der Denaturierung geht die geordnete Konfiguration der Aminosäuren im Molekül verloren, was dadurch angezeigt wird, daß die hohe negative optische Drehung des nativen Materials nach der Denaturierung auf den Mittelwert der optischen Drehung aller im Kollagen enthaltenen Einzelaminosäuren gefallen ist.
2. Die Moleküle verlieren ihre asymmetrische Form und nehmen die Gestalt statistischer Knäuel an. Dies wird u. a. dadurch bewiesen, daß die Endwerte der Viskosität und Lichtstreuung für diese Form charakteristisch sind.
3. Die Moleküle zerfallen, wie aus den Ultrazentrifugenuntersuchungen und der Abnahme des Gewichtsmittels des Molekulargewichts ersichtlich ist, in ihre Einzelteile.

Zur Klärung der Frage nach der zeitlichen Reihenfolge, dem eventuellen Zusammenhang und Mechanismus dieser Vorgänge, wäre es wünschenswert, den Ablauf jedes einzelnen möglichst gleichzeitig mit den anderen während der Denaturierung verfolgen zu können.

Die optische Drehung bietet sich zur Verfolgung des 1. Vorganges an, da sie nur auf konfigurative Änderungen anspricht. Die Viskosität hängt jedoch, wie erwähnt, sowohl von der Asymmetrie der Moleküle, wie auch - im weit schwächeren Masse - vom Molekulargewicht ab. Mit ihrer Abnahme wird demnach sowohl der 2. wie auch der 3. Vorgang verfolgt.

Diese beiden Methoden wurden von Doty und Nishihara¹⁸⁾ zur Untersuchung des Denaturierungsmechanismus herangezogen. Dabei ist es ein fast unüberwindbares experimentelles Problem, die zu vergleichenden Drehungs- und Viskositätswerte an Punkten gleichen Denaturierungszustandes zu messen, da eine gleichzeitige Messung an einer Probe nicht möglich ist. Wegen der großen Temperaturabhängigkeit der Denaturierung (s. V.3) stellen kleine Temperaturunterschiede sowie die unvermeidbar verschiedenen Aufheizzeiten in beiden Methoden die exakte Vergleichbarkeit der Werte in Frage.

Die Autoren fanden, daß bei 35° C die Abnahme der optischen Drehung ausgedrückt als $[\alpha] - [\alpha]_d / \Delta [\alpha]$ gleichschnell ist wie der Abfall der Viskosität $\eta_{sp} - \eta_{sp,d} / \Delta \eta_{sp}$ ($[\alpha]$, η_{sp} = spez. optische Drehung, spez. Viskosität zur Zeit t; $[\alpha]_d$, $\eta_{sp,d}$ = spez. optische Drehung, spez. Viskosität für den denaturierten Zustand, und $\Delta [\alpha]$, $\Delta \eta_{sp}$ Gesamtunterschied zwischen der spez. optischen Drehung, spez. Viskosität des nativen und denaturierten Tropokollagens). Sie postulierten daraus einen alles-oder-nichts-Prozeß der Denaturierung, in dem jedes Molekül ohne Zwischenstufen gleichzeitig mit dem Verlust seiner Struktur in die Komponenten zerfallen soll.

Von uns wurde zusätzlich zu den genannten Methoden die Verfolgung der Denaturierung mit der Lichtstreuung herangezogen. Diese Methode hat den Vorteil, gleichzeitig für jeden Meßpunkt an der gleichen Probe das Gewichtsmittel des Molekular-

gewichts und eine Maßzahl für die Länge und Starrheit der Moleküle zu liefern. Ein weiterer, großer Vorteil dieser Methode gegenüber der Viskositätsmessung liegt darin, daß ohne Extrapolation auf unendliche Verdünnung aus dem Ordinatenabschnitt das Gewichtsmittel des Molekulargewichts und aus der Winkelabhängigkeit die Asymmetrie folgen. Diese Art der Auswertung ist allerdings nur unter der Annahme erlaubt, daß der 2. und 3. Virialkoeffizient der Gl. 15 nicht nur für das native und denaturierte Tropokollagen, sondern auch für alle Übergangszustände Null sind, eine Annahme, die sicherlich im Hinblick auf die erreichte Meßgenauigkeit erlaubt ist. Eine Extrapolation auf die Konzentration Null, wie sie zur Ermittlung der Viskositätszahlen notwendig ist, ist experimentell schwierig, da die Versuche bei verschiedenen Konzentrationen unter genau gleichen Bedingungen (Temperatur, Aufheizzeit) laufen müssen. Sie wird unmöglich, wenn die Kinetik als solche konzentrationsabhängig ist (s. VI.2).

V.2 Eigene Resultate

Die Abb. 19 zeigt eine Zimmauftragung der während der isothermen Denaturierung bei $35,0^{\circ}\text{C}$ gemessenen Lichtstreuungswerte. Die hohe Anfangsneigung der Lichtstreuung ($\text{tg } \alpha$) für das native Tropokollagen (diese wurde bei 20°C gemessen) fällt langsam ab und zeigt an, daß die Moleküle ihre asymmetrische Form verlieren. Gleichzeitig wächst der Ordinatenabschnitt $= 1/M$, d.h. das Gewichtsmittel des Molekulargewichts fällt. Abb. 20 zeigt ein ähnliches Experiment bei $39,0^{\circ}\text{C}$. Der $\text{tg } \alpha$ erreicht hier bereits nach 5 Min. seinen Endwert, während das Gewichtsmittel des Molekulargewichts bedeutend langsamer abfällt.

Abb. 21 a, b, c und d zeigt die Ergebnisse dieser und weiterer Lichtstreuungsversuche bei verschiedenen Temperaturen zusammen mit der Abnahme der Viskosität und der optischen Drehung. Auf der Abszisse ist in allen vier Diagrammen die mit der Aufheizzeit korrigierte Versuchsdauer von 0 - 120 Min. aufgetragen. Dabei sind in Abb. 21 c und d auch bei

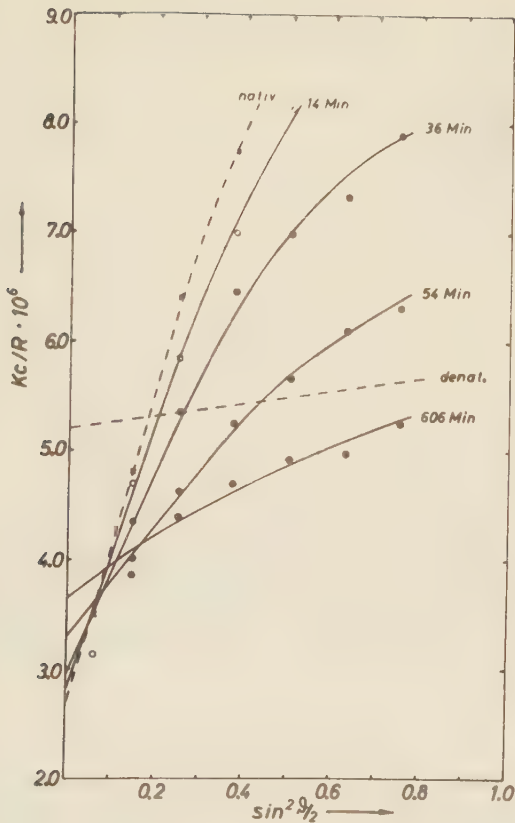


Abb. 19

Isotherme Denaturierung bei 35,0° C verfolgt mit der Lichtstreuung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (HAc II);
c = 0,018 g/100 ml in 0,025 m Citratpuffer; pH 3,7;
Symbole s. VII

gleicher Temperatur und verschiedener Konzentration gemessene Werte eingezeichnet. Die Meßdaten der optischen Drehung schwanken durch die unvermeidlichen Aufheiz- und Temperaturschwankungen in der mit dem Gehäuse des Polarimeters wärmeleitend verbundenen Zelle stark, doch ist eine Abhängigkeit von der Konzentration nicht feststellbar. Die

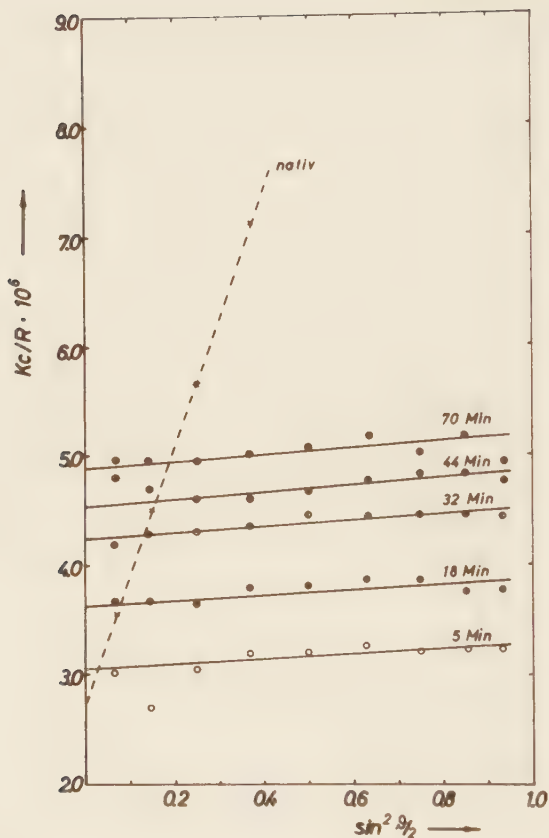


Abb. 20

Isotherme Denaturierung bei 39,0° C verfolgt mit der Lichtstreuung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (HAc II); $c = 0,0125$ g/100 ml in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7;

Konzentrationsabhängigkeit der Viskositätskurven scheint durch die normale Konzentrationsabhängigkeit der η_{sp}/c -Werte (s. II.12) verursacht zu sein. Unter der Annahme, daß der eigentliche Vorgang, der die Abnahme der Viskosität bewirkt, konzentrationsunabhängig ist und somit nach gleichen Zeiten der gleiche Denaturierungszustand vorliegt,

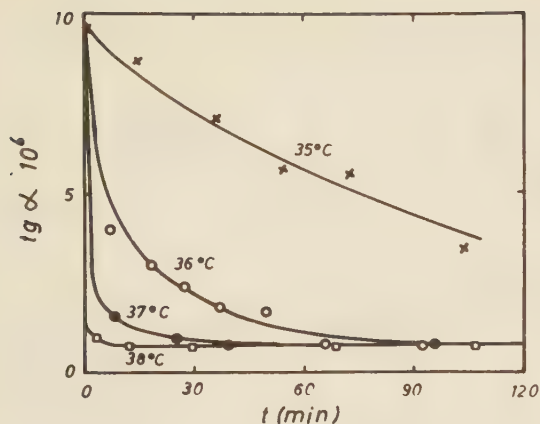


Abb. 21 a

Abnahme der Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit $\lg \alpha$ bei der Lichtstreuung

$c = \text{ca. } 0,015 \frac{\text{g}}{100 \text{ ml}}$

Abb. 21 a, b, c und d

Denaturierung bei verschiedenen Temperaturen verfolgt mit der Lichtstreuung, der Viskosität und optischen Drehung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (HAc II) in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7;

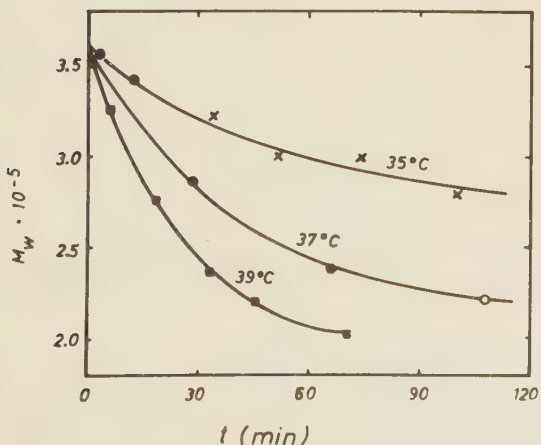


Abb. 21 b

Abnahme des Gewichtsmittels des Molekulargewichts M_w gemessen mit der Lichtstreuung

$c = \text{ca. } 0,015 \frac{\text{g}}{100 \text{ ml}}$

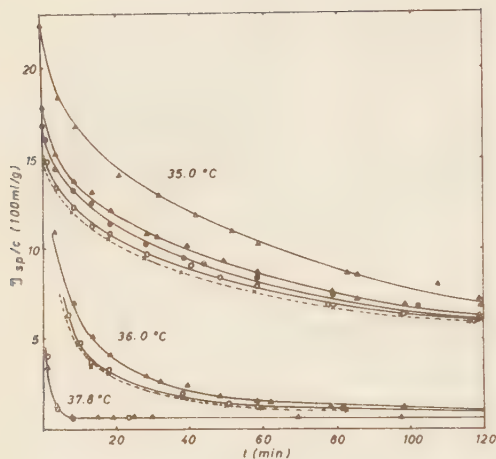


Abb. 21 c

Abnahme der
 η_{sp}/c -Werte

- Δ $c = 0,054$ g/100ml
- $\blacktriangle$ $= 0,021$ "
- $\bullet$ $= 0,012$ "
- $\circ$ $= 0,008$ "

--- nach der in
Abb. 22 gezeig-
ten Methode auf
 $c = 0$ extrapo-
liert.

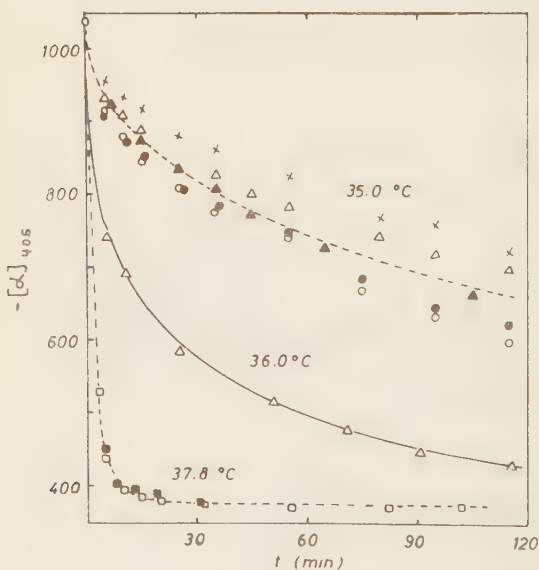


Abb. 21 d

Abnahme der nega-
tiven optischen
Drehung bei
405 m/μ

- Δ $c = 0,205$ g/100 ml
- $\square$ $= 0,149$ "
- $\blacktriangle$ $= 0,113$ "
- $\bullet$ $= 0,083$ "
- $\blacksquare$ $= 0,078$ "
- $\times$ $= 0,054$ "
- $\circ$ $= 0,014$ "

--- Mittelwerte

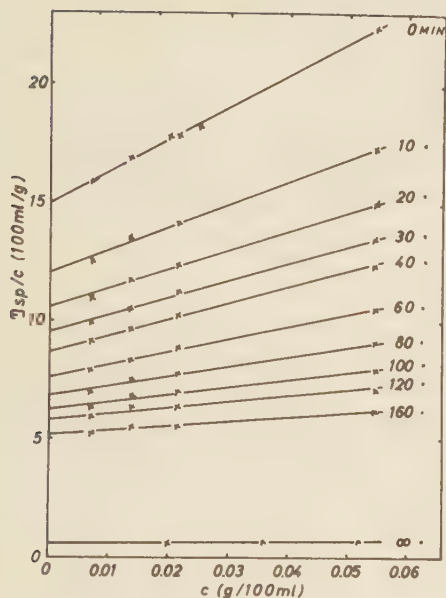


Abb. 22

Extrapolation der bei gleichen Zeiten gemessenen η_{sp}/c -Werte auf die Konzentration Null für $T = 35,0^\circ \text{C}$

Die Zeiten geben die Dauer der Denaturierung bei $35,0^\circ \text{C}$ an (Abszissenwerte der Abb. 21 c)

0: nativ

∞ : vollständig denaturiert

wurden in Abb. 22 die nach gleichen Zeiten gemessenen η_{sp}/c -Werte gegen die Konzentration aufgetragen. Für die gemachte Annahme spricht, daß die Konzentrationsabhängigkeit linear ist und entsprechend dem mit der Zeit fortschreitenden Verlust an Symmetrie abfällt. Eine Untersuchung, ob die Abnahme des $\text{tg } \alpha$ und des Gewichtsmittels des Molekulargewichts konzentrationsabhängig sind, konnte nicht durchgeführt werden, da die ohnehin sehr kleinen Konzentrationen entsprechend der Reinigungsmethode (s. II.10) nur in kleinen Grenzen variiert werden konnten.

Schon aus einer nur qualitativen Betrachtung der Kurven in Abb. 21 geht hervor, daß der Denaturierungsvorgang in mindestens zwei Stufen verläuft. Der $\text{tg } \alpha$, die optische Drehung und die Viskosität fallen mit etwa gleicher Geschwindigkeit (Stufe 1), während das Gewichtsmittel des Molekulargewichts bedeutend langsamer absinkt (Stufe 2). Zur weiteren Untersu-

chung des Denaturierungsmechanismus wurden die Kurven der Abb. 21 auf ihre Reaktionskinetik untersucht.

V.3 Reaktionskinetische Analyse

Zum Einsetzen in die reaktionskinetischen Gleichungen erschien es als zweckmäßig, die Meßdaten der Abb. 21 in die Form

$$\frac{X_t - X_d}{X_o - X_d} \quad (24)$$

umzurechnen, da dieses Verhältnis unter gewissen Voraussetzungen (siehe unten) gleich dem Verhältnis des zur Zeit t noch nativen Anteils n_t zur Anfangsmenge n_o ist:

$$\frac{X_t - X_d}{X_o - X_d} = \frac{n_t}{n_o} \quad (25)$$

Daran bedeutet X wahlweise $\text{tg} \alpha$, M_w , $[\eta]$, $[\alpha]$ und die Indices bedeuten: o = zur Zeit 0, d.h. vor Beginn der Denaturierung gemessen, t = zur Zeit t während der Denaturierung gemessen und d = Endwert des vollständig (90 Min. bei 38°C) denaturierten Tropokollagens.

Der Begriff der Denaturierung steht hier, solange die Frage, inwieweit die verschiedenen meßbaren Erscheinungen (Abfall der optischen Drehung, des Molekulargewichts usw.) Ausdruck eines oder verschiedener Vorgänge sind, ungeklärt ist zunächst für verschiedene Prozesse. So bedeutet z. B. vollständig denaturiert im Sinne der optischen Drehung, daß diese ihren Endwert erreicht hat, d.h. daß alle durch die Denaturierung zerstörbaren optisch aktiven Konfigurationen zerstört sind. Vollständig denaturiert im Sinne des Molekulargewichts heißt, daß alle nativen Moleküle vollständig zerfallen sind. Die Konzentration an Undenaturiertem zur Zeit t (n_t) bedeutet bei der optischen Drehung die "Konzen-

tration" an noch vorhandenen, zerstörbaren optisch aktiven Konfigurationen und beim Abfall des Molekulargewichts die Konzentration an unzerfallenen Molekülen.

Die Gleichung 25 gilt für die optische Drehung und den $\text{tg}\alpha$ unter folgenden Bedingungen:

1. Die Meßeffekte verhalten sich additiv,
2. sie sind während des ganzen Vorganges der Konzentration des Anteils proportional durch den sie hervorgerufen werden.

Beide Annahmen gelten a priori nur für die optische Drehung⁶¹⁾. Für den $\text{tg}\alpha$ ist ihre Geltung durch die Theorie der Lichtstreuung für Mischungen von Molekülen verschiedener Gestalt bisher nicht bewiesen. Da im Falle der Viskosität obige Bedingungen sicher nicht zutreffen, ist eine kinetische Analyse der Viskositätsdaten nicht möglich. Für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts gilt Gleichung 25, wie leicht bewiesen werden kann, nur im Falle einer der folgenden Zerfallsarten:

- a) Jedes Molekül zerfällt in die gleiche Zahl und Art von Zerfallsprodukten.
- b) Jedes Molekül zerfällt statistisch in mehr als einer Weise.
- c) Verschiedene Arten von Molekülen zerfallen mit gleicher Geschwindigkeit.

Da das sauer extrahierte Tropokollagen im wesentlichen aus Molekülen des Typs II, die aus einer α - und einer β -Komponente zusammengesetzt sind, (s. IV,3) besteht, erscheint der Mechanismus a) als wahrscheinlich und die Gleichung 25 ist erfüllt.

Zum anschaulichen Vergleich der Abnahme des mit den verschiedenen Methoden bestimmten nativen Anteils sind in Abb. 23 a, b und c die nach Gleichung 25 aus den Daten der optischen Drehung, des $\text{tg}\alpha$ bzw. des Gewichtsmittels des Molekulargewichts berechneten Verhältnissen n_t/n_0 für drei verschiedene Temperaturen gegen die Zeit aufgetragen. Wie bereits aus Abb. 21 hervorging, ist der Zerfall der Moleküle (Abnahme

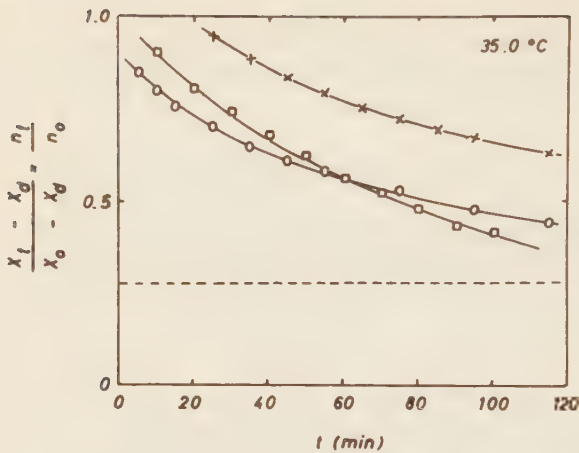


Abb. 23 a, b und c
Abnahme des Verhältnisses des zur Zeit t noch nativen Anteils n_t zur Anfangsmenge n_0 mit der Zeit bei drei Temperaturen

Punkte:

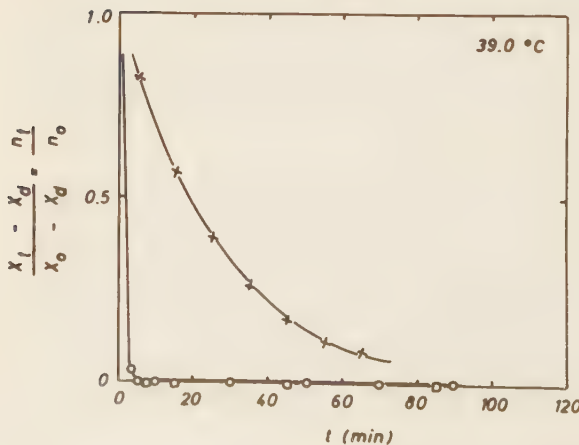
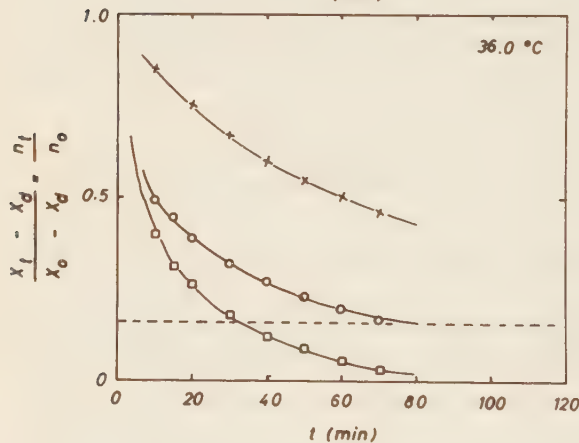
- X = $[\alpha]_{405 \text{ m}/\mu}$
 □ X = $\text{tg } \alpha$
 × X = M_w

Die Indices bedeuten:

o = zur Zeit Null, d.h. vor Beginn der Denaturierung gemessen;

d = Endwert des vollständig (90 Min. bei 38° C) denaturierten Tropokollagens;

--- = für die Auftragung nach Gl. 31 angenommener Gleichgewichts-Endwert der optischen Drehung;



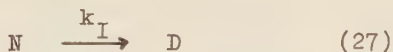
von M_w) besonders bei höheren Temperaturen bedeutend langsamer als die Abnahme der durch die optische Drehung angezeigten konfigurativen Ordnung, die ungefähr mit der gleichen Geschwindigkeit wie der $\lg \alpha$ abfällt. Die Abb. 23 zeigt außerdem, daß die Kurve der optischen Drehung im Gegensatz zu der des $\lg \alpha$ nicht auf den Wert $n_o/n_t = 0$ einläuft, sondern einen temperaturabhängigen Gleichgewichts-Endwert zuzustreben scheint. In der Abb. 23 sind die geschätzten Endwerte als gestrichelte Linien eingezeichnet. Diese stimmen ziemlich genau mit den Endwerten der optischen Drehung überein, die sich bedeutend rascher bei der Denaturierung schon einmal denaturierter und anschließend möglichst vollständig, d.h. unter Temperaturwechsel, renaturierter Tropokollagenlösungen einstellen (s. VI, 2b, 2c und Abb. 34 a, Kurve I). Die Einstellung von temperaturabhängigen Gleichgewichten deutet darauf, daß beim Zerfall der konfigurativen Ordnung eine Rückreaktion auftritt.

V.4 Reaktionsordnung

Würde die Abnahme des undenaturierten Anteiles n mit der Zeit eine Reaktion erster Ordnung sein, so müßte gelten:

$$\lg \frac{n_o}{n_t} = \frac{k_I}{2,303} t \quad (26)$$

Die erste Reaktionsordnung wäre im einfachsten Falle durch einen Mechanismus

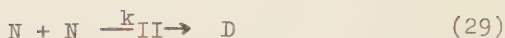


erklärbar, wobei N das native Molekül bzw. die noch native Einheit und D das Denaturierte symbolisieren.

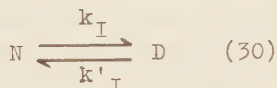
Für eine Reaktion zweiter Ordnung wäre

$$\frac{n_o}{n_t} = n_o k_{II} t + 1 \quad (28)$$

Eine solche Reaktionsordnung wäre zu erwarten, wenn eine bimolekulare Reaktion den Zerfall hervorrufen würde:



Außerdem soll für den Fall der optischen Drehung noch ein Mechanismus der Form



diskutiert werden.

Für diese Reaktion erster Ordnung mit Rückreaktion, die gleichfalls erster Ordnung ist, gilt die Gleichung:

$$\lg \frac{n_0}{n_t - K(n_0 - n_t)} = \frac{k_I + k'_{-I}}{2,303} t \quad (31)$$

Darin ist

$$K = \frac{k'_{-I}}{k_I} = \frac{C_N}{C_D} = \frac{X_t - X_d}{X_0 - X_t} \quad (32)$$

und, wie aus Gleichung 25 folgt, gilt

$$\frac{n_0}{n_t - K(n_0 - n_t)} = \frac{X_0 - X_d}{X_t - X_d - K(X_0 - X_t)} \quad (33)$$

In Abb. 24 a und b ist der reziproke Ausdruck 24 berechnet aus der optischen Drehung, dem $\lg \alpha$ bzw. dem Gewichtsmittel des Molekulargewichts im logarithmischen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen. In diese Auftragung müssen nach Gleichung 26 Reaktionen erster Ordnung Geraden ergeben. Dies ist für alle drei Temperaturen sehr gut für den Abfall des Molekulargewichts erfüllt. Dabei wurde ein M_0 -Wert von $3,3 \cdot 10^5$ ($= M_\alpha + M_\beta$) (s. III.3) an Stelle des Molekulargewichtes des nativen Tropokollagens von $3,6 \cdot 10^5$ angenommen, um Anfangswerte des Ausdrucks 24, die kleiner als 1 sind, zu vermeiden. Diese Korrektur ist vernünftig, wenn man annimmt, daß sich in der Lösung kleine Mengen höherer Aggregate befinden.

Recht gut liegen auch die Punkte des Abfalls des $\lg \alpha$ auf Geraden, während die optische Drehung schneller verläuft, als durch die erste Ordnung erklärbar ist und somit eine Krümmung nach unten auftritt.

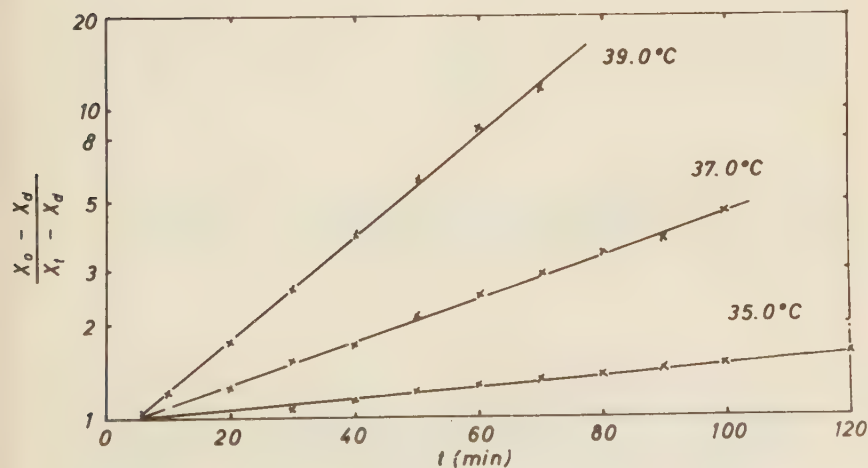
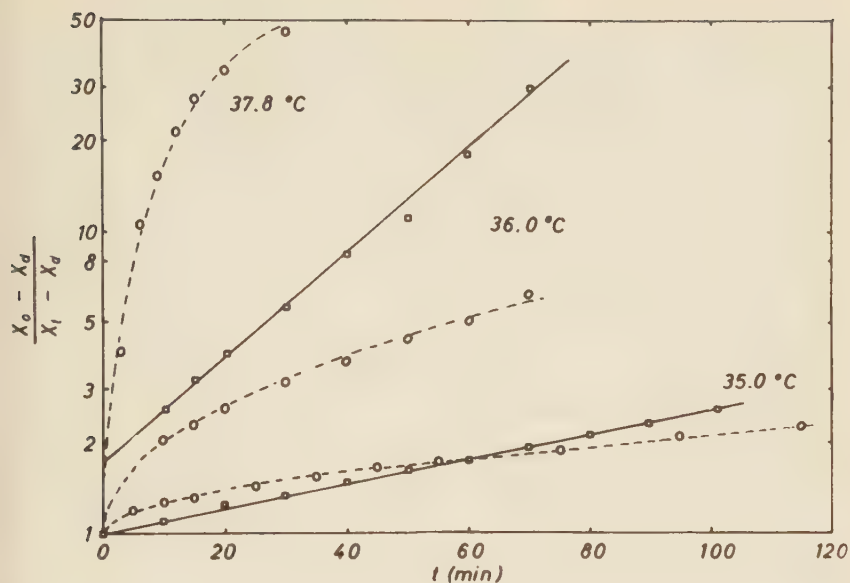


Abb. 24 a und b

Logarithmische Auftragung zur Prüfung der Anwendbarkeit von Gleichung 26 für Reaktionen 1. Ordnung

Bedeutung der Punkte und Indices wie in Abb. 23

Die Geraden beginnen oft nicht genau, wie theoretisch gefordert, im Punkte $t = 0$, $n_o/n_t = 1$, doch scheint dies im Hinblick auf die recht undefinierten Anfangsbedingungen (Aufheizzeit) nicht sehr schwerwiegend.

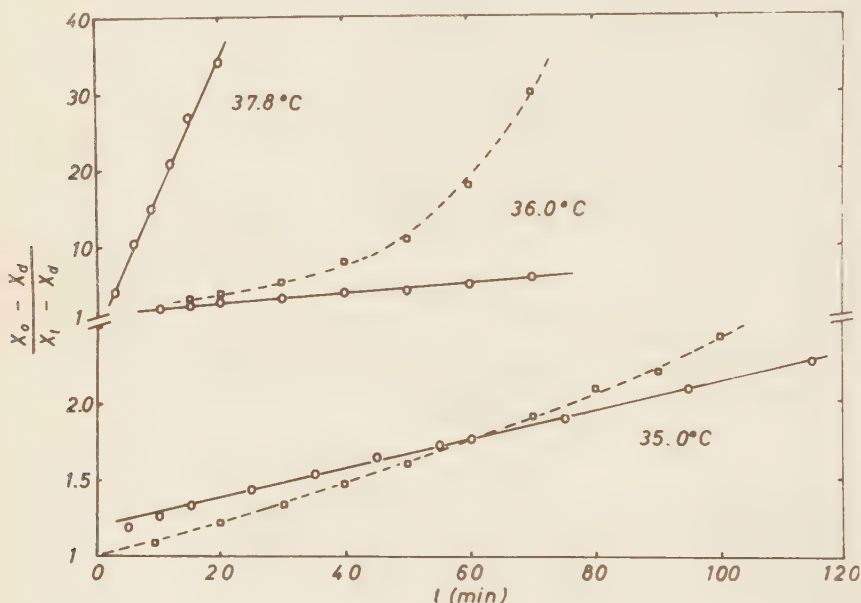


Abb. 24 c

Lineare Auftragung zur Prüfung der Anwendbarkeit von Gleichung 28 für Reaktionen 2. Ordnung

Bedeutung der Punkte und Indices wie in Abb. 23;

In Abb. 24 c sind die Werte der optischen Drehung zusammen mit denen des $\text{tg} \alpha$ nach Gleichung 28 in einem linearen Maßstab aufgetragen. In dieser Darstellung müßte eine Reaktion zweiter Ordnung eine Gerade ergeben. Während die $\text{tg} \alpha$ -Werte auf Kurven liegen, ist dies überraschend gut der Fall für die optische Drehung. Gegen die Annahme einer zweiten Ordnung für den Abfall der optischen Drehung spricht jedoch, die Unabhängigkeit dieses Vorganges von der Anfangskonzentration an Tropokollagen (s. Abb. 21 d und V.2). Man könnte

allerdings daran denken, daß die Wechselwirkung zwischen zwei optisch aktiven Zentren, die zum nach der zweiten Ordnung verlaufenden Zerfall der aktiven Konfiguration führt, innerhalb eines Moleküls stattfindet und so von der Eiweißkonzentration unabhängig ist. Viel plausibler ist jedoch besonders im Hinblick auf das oben Gesagte (V.3) eine unvollständige Reaktion erster Ordnung des Typs 30. Trägt man die Werte nach Gleichung 31 auf, (Abb. 24 d) und stellt dabei die folgenden aus Abb. 23 geschätzten Gleichgewichtswerte in Rechnung: für 35,0° C; $K = 0,39$; 36,0° C; $K = 0,20$ und 37,8° C; $K = 0,02$; so ergibt sich eine sehr gute Linearität. Wie erwähnt (V.3) stimmen diese K-Werte gut mit den Denaturierungsendwerten des vorher denaturierten und unter Temperaturwechsel renaturierten Kollagens (Kurve I der Abb. 34 a) überein.

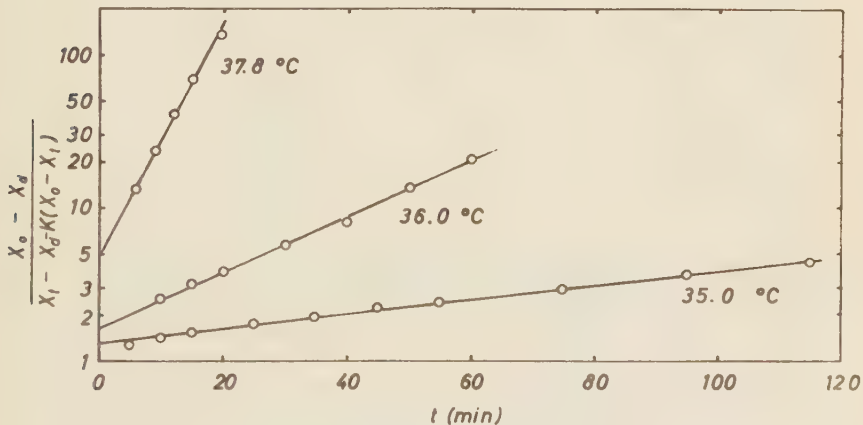


Abb. 24 d

Logarithmische Auftragung zur Prüfung der Anwendbarkeit von Gleichung 31 für eine unvollständig verlaufende Reaktion, die in beiden Richtungen nach der 1. Ordnung verläuft

Punkte und Indices wie in Abb. 23

K = Gleichgewichtskonstante

Tab. V.

Kinetische Daten der Denaturierung.

Vorgang	Abnahme von	Reaktions- ordnung	Geschwindig- keitskonstante k_I (sec ⁻¹)	E* (kcal/mol)	ΔF^* (kcal/mol)	ΔS^* (cal/grad)
1	$\frac{[a]_0 - [a]_d}{[a]_t - [a]_d}$	I mit Rückreaktion I. Ordnung	-	-	-	-
2	$\frac{tg\alpha_0 - tg\alpha_d}{tg\alpha_t - tg\alpha_d}$	I	$1.58 \cdot 10^{-4}$ (35°C) $6.72 \cdot 10^{-4}$ (36°C)	260	22.6 (36°C)	770
3	$\frac{M_{w,0} - M_{w,d}}{M_w - M_{w,d}}$	I	$0.70 \cdot 10^{-4}$ (35°C) $2.68 \cdot 10^{-4}$ (37°C) $6.93 \cdot 10^{-4}$ (39°C)	108	23.6 (36°C)	270

Erklärung der Symbole s. VII.

V.5 Temperaturabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit

In der Tabelle V sind die aus den Auftragungen in Abb. 24 bestimmten Geschwindigkeitskonstanten k_I der Abnahme des $\text{tg } \alpha$ und des Gewichtsmittels des Molekulargewichts für verschiedene Temperaturen zusammengestellt. Die Aktivierungsenergien E wurden daraus mit Hilfe der üblichen logarithmischen Auftragung gegen die reziproke, absolute Temperatur (Abb. 25) bestimmt.

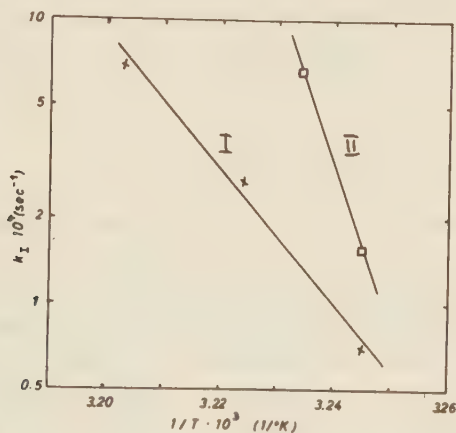


Abb. 25

Logarithmische Auftragung der Geschwindigkeitskonstanten gegen die reziproke, absolute Temperatur zur Berechnung der Aktivierungsenergien

Daten aus Abb. 24;

Kurve I für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts

Kurve II für die Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit bei der Lichtstreuung

Aus diesen wurde nach der Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten von Eyring⁶²⁾ mit

$$k_I = \frac{kT}{h} e^{-\frac{\Delta F^*}{RT}}; \quad \Delta F^* = \Delta H^* - T\Delta S^*; \quad \Delta H^* = E^* - kNT$$

(ΔH^* = Aktivierungswärme; k = Boltzmann-Konstante; h = Planck'sches Wirkungsquantum)

die Änderung der freien Aktivierungsenergie ΔF^* und der Aktivierungsentropie ΔS^* , die während der Bildung des aktivierten Zustandes auftreten, berechnet.

Abgesehen von der großen Ungenauigkeit der Bestimmung aus drei (im Falle des $\text{tg } \alpha$ sogar nur zwei) Messungen bei verschiedenen Temperaturen, ist bei der Diskussion dieser Werte zu beachten, daß sie durch die Veränderung des pH bzw. durch die Verschiebung anderer Dissoziationsgleichgewichte bei der Temperaturänderung erheblich verfälscht sein können⁶²⁾. Trotzdem erscheinen die Daten der Tabelle V für mehr qualitative Schlußfolgerungen wesentlich.

V.6 Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß der Mechanismus der Denaturierung komplizierter ist, als von Doty und Nishihara¹⁸⁾ zunächst angenommen (s. V.1) wurde. Durch die Verfolgung der Abnahme des Gewichtsmittels des Molekulargewichts, welche den Zerfall der Moleküle, also den in der Einleitung (V.1) mit 3 bezeichneten Vorgang, widerspiegelt, konnte gezeigt werden, daß dieser bedeutend langsamer abläuft als die Vorgänge 1 (Zerfall der optisch aktiven Konfigurationen) und 2 (Zusammenbruch der geordneten, asymmetrischen Molekülgestalt). Die Ergebnisse von Doty und Nishihara scheinen nicht, wie von den Autoren angenommen, den gleichzeitigen Ablauf der Vorgänge 1 und 3, sondern nur der Vorgänge 1 und 2 zu beweisen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich das folgende Bild für den Denaturierungsmechanismus:

Die Denaturierung verläuft in zwei Stufen, wobei man in der ersten zwei mehr oder weniger parallele Schritte unterscheiden kann.

1. Stufe: In dieser bricht die hochgeordnete Struktur der Kollagenmoleküle zusammen. Dabei verändert sich sowohl die äußere Molekülgestalt - der Verlust des hohen Achsenverhältnisses wird durch den Abfall der Viskosität und des $\text{tg } \alpha$ angezeigt - wie auch die mit der optischen Drehung verfolgbare

innere Ordnung. Die reaktionskinetische Analyse hat gezeigt, daß sich diese während der ersten Stufe mehr oder weniger parallel verlaufenden Schritte in ihrem Reaktionsmechanismus unterscheiden. Daß der Zusammenbruch der äußeren Molekülgestalt (angezeigt durch den $\text{tg } \alpha$) nach der ersten Ordnung verläuft, ist plausibel. Die beobachtete unvollständige Reaktion erster Ordnung für den Zerfall der optisch aktiven Konfigurationen (optische Drehung) ist mit Hilfe unserer Kenntnis über die Renaturierung von Tropokollagen (VI.1) verständlich. Demnach können sich nämlich verhältnismäßig leicht innerhalb einer einzelnen Peptidkette - wahrscheinlich unter Stabilisierung mit Wasser²³⁾ - optisch aktive Konfigurationen zurückbilden, (Aufbau von Einzelhelix-Bereichen), während ein den $\text{tg } \alpha$ und das Gewichtsmittel des Molekulargewichtes beeinflussender Wiederzusammentritt von Einzelketten bei diesen hohen Temperaturen noch nicht, bzw. mit sehr kleiner Geschwindigkeit zu erfolgen scheint.

Der 1.

Dieser Vorgang tritt als Rückreaktion in Erscheinung und führt zu einem temperaturabhängigen Gleichgewicht. Die genaue Bestimmung des Gleichgewichts ist wegen der Langsamkeit der Einstellung beim nativen Tropokollagen schwierig, doch stellen sich ähnliche - vielleicht gleiche - Gleichgewichte beim renaturierten Tropokollagen rasch ein.

Aus den Unterschieden der freien Energie und der Entropie (ΔF^* und ΔS^*) zwischen dem nativen und dem aktivierten Zustand lassen sich Aussagen über das aktivierte Tropokollagenmolekül machen. Nach der modernen Theorie der thermischen Denaturierung von Proteinen⁶³⁾ wird angenommen, daß in der aktivierten Stufe gerade alle Wasserstoffbrücken, die die Struktur stabilisieren, gleichzeitig geöffnet sind. Um die Theorie der absoluten Reaktionsgeschwindigkeiten von Eyring⁶²⁾ anwenden zu können, muß die aktivierte Stufe außerdem die Eigenschaft haben, mit gleicher Wahrscheinlichkeit sowohl in die Produkte abzureagieren, wie auch die Ausgangsform zurückzubilden. Im Falle des Tropokollagens erscheint letztere Möglichkeit aber nur dann gegeben, wenn sich die Lage der Ketten zueinander noch nicht verändert hat. Der Übergang der

Ketten in den ungeordneten, geknäuelten Zustand mit dem damit verbundenen großen Entropieanstieg erfolgt demnach erst nach Überschreiten des Aktivierungsberges. Durch den Wegfall einer einzigen Wasserstoffbrücke gewinnen jedoch meist mehrere Bindungen in der Peptidkette ihre freie Drehbarkeit zurück. Der dadurch bedingte Entropiezuwachs von $5 \text{ cal/grad}^{(63)}$ pro Bindung genügt, um bei sonst unveränderter, molekularer Anordnung die beobachteten hohen Aktivierungsentropien zu erklären.

Diese ermöglichen überhaupt erst, daß die Denaturierung trotz der gleichfalls sehr hohen Aktivierungsenergie bei niedrigen Temperaturen abläuft. Bekanntlich verläuft nämlich eine Reaktion dann leicht, wenn die freie Energie der Aktivierung

$$\Delta F^* = E^* - \Delta S^* T \quad \text{klein ist.}$$

Die in dieser Arbeit für die 1. Stufe der Denaturierung des Tropokollagens gefundene Aktivierungsentropie von 770 cal/grad liegt höher als die höchsten bisher bei Eiweißdenaturierungen gemessenen Werte von $500 \text{ cal/grad}^{(62)}$. Dies läßt sich vielleicht mit der strukturellen Besonderheit des Kollagens deuten, daß die Tertiärstruktur der Tripelhelix durch Wasserstoffbrücken stabilisiert wird, die zwischen den Carboxyl- und den NH-Gruppen der Peptidbindungen wirken. Bei Proteinen, die die weitverbreitete α -Helix besitzen, sind diese Bindungen bereits für die Bildung der Sekundärstruktur, d.h. der Einzelhelices verwendet und für die Stabilisierung der Tertiärstruktur stehen nur die polaren Gruppen der Seitenketten zur Verfügung.

2. Stufe: Nach Vollendung der 1. Stufe sind die Einzelketten des Moleküls noch irgendwie verbunden. Sie trennen sich in einem bedeutend langsameren Vorgang, der wahrscheinlich erst durch den Zusammenbruch der Struktur im 1. Schritt ermöglicht wird. Diese Stufe verläuft, wie für eine Zerfallsreaktion zu erwarten ist, nach der ersten Ordnung (Tab. V). Überraschend ist die relativ hohe Aktivierungsentropie der 2. Stufe. Dieses deutet daraufhin, daß auch die Zwischenstufe

nach der 1. Stufe noch eine gewisse strukturelle Ordnung aufweist, die bei der Bildung des aktivierten Zustandes aufgehoben wird.

Wie erwähnt, sind aus den "thermodynamischen" Daten der Aktivierung (ΔS^* und ΔF^*) nur Aussagen über die aktivierten Stufen möglich. Interessant wären die wirklich thermodynamisch, im Gleichgewicht gemessenen Entropiewerte für den 1. und 2. Schritt (ΔS_1 und ΔS_2). Daraus wären vielleicht weitere Aussagen über die in der Zwischenstufe noch erhalten gebliebene molekulare Ordnung möglich. Da schon in der Zwischenstufe und noch mehr in den Endprodukten zusätzlich zur freien Drehbarkeit noch Freiheitsgrade der Translation hinzugekommen sind - die Lichtstreuungsergebnisse beweisen die Form des statistischen Knäuels - ist zu erwarten, daß die ΔS -Werte noch größer sind, als die korrespondierenden ΔS^* -Werte.

Eine unabhängige Stütze für diesen Zweistufenmechanismus der Denaturierung liefert das Renaturierungsverhalten von bis zum Endwert der optischen Drehung, Viskosität und $\text{tg} \alpha$ (11 Min. bei $38,0^\circ \text{ C}$) denaturiertem Tropokollagen im Gegensatz zu dem bis zum vollständigen Zerfall in die Einzelketten (90 Min. bei $38,0^\circ \text{ C}$) denaturierten Material. Bei dem erstgenannten steigen die Viskosität und optische Drehung bedeutend rascher wieder an als beim 90 Min. denaturierten (s. VI.2a). Das 11 Min. denaturierte Tropokollagen verhält sich damit ganz ähnlich, wie die γ -Komponente, in der chemische Bindungen für eine, im Gegensatz zu der postulierten Zwischenstufe, thermisch stabilen Verbrückung der Einzelketten sorgen. Diese Bindungen erhalten wahrscheinlich das richtige Register zwischen den Ketten und ermöglichen damit eine schnellere und vollkommenere Rückbildung einer kollagenähnlichen Struktur (s. VI.1).

VI. DER RENATURIERUNGSVORGANG

VI.1 Einleitung und Literaturergebnisse

Unter Renaturierung versteht man nicht nur im wörtlichen Sinne die völlige Wiederherstellung der nativen Moleküle, sondern bezeichnet damit auch die Rückbildung einer kollagenähnlichen Struktur bei Temperaturen, die unter der Denaturierungstemperatur liegen. Ähnlich wie bei der Denaturierung dient das Wort als Dachbegriff für mehrere, verschiedene Vorgänge, wie die Rückbildung optisch aktiver Konfigurationen, der Molekülgestalt, der Röntgenstruktur usw.

Für die Wiederherstellung einer Struktur, die zumindest in bestimmten Zügen der des Kollagens ähnlich ist, sind aus der Literatur folgende Hinweise bekannt:

Die optische Drehung der denaturierten Lösungen steigt nach deren Abkühlung auf 4°C innerhalb einiger Tage um etwa 80 % des Drehwertunterschiedes zwischen nativem und denaturiertem Tropokollagen wieder an^{64,65,66,23,24)}. Die Geschwindigkeit dieses Anstieges ist unabhängig von der Konzentration und soll eine Reaktion 2. Ordnung^{23,24)} sein. Die Konzentrationsunabhängigkeit zeigt, daß es sich hier wie beim Abfall der optischen Drehung während der Denaturierung um einen intramolekularen Vorgang handelt. Es wäre zu prüfen, ob sich nicht auch die scheinbare 2. Ordnung - zu der die Konzentrationsunabhängigkeit im Widerspruch steht - wie bei der Denaturierung (s. V.4) durch eine Reaktion 1. Ordnung mit Rückreaktion erklären ließe. Nach etwa 10 Stdn. bei 4°C ist bei etwa 90 % des Gesamtanstieges ein vorläufiger Endwert erreicht. Eine weitere, sehr langsame und etwas konzentrationsabhängige Zunahme erstreckt sich über mehrere Wochen. Der Endwert der optischen Drehung ist konzentrationsunabhängig.

Auch die Viskosität steigt wieder an^{23,24)}. Im Gegensatz zur optischen Drehung ist dieser Vorgang sehr stark konzentrationsabhängig - bedeutend stärker, als durch die normale Konzentrationsabhängigkeit der η_{sp}/c -Werte (s. II.2) erklärt werden kann. Ein weiterer Gegensatz besteht darin, daß die

Viskosität in keinen Endwert einmündet, sondern selbst nachdem die optische Drehung bereits konstant ist, weiter ansteigt. Dieses Verhalten deutet auf eine Aggregation^{23,24)}, obwohl durch Viskositätsmessungen allein nicht entschieden werden kann, inwieweit auch Änderungen der Molekülgestalt auftreten. Schon kleine Mengen stark asymmetrischer Moleküle würden die Viskosität wesentlich erhöhen. Sowohl die Rückkehr der optischen Drehung wie auch der Viskosität besitzen einen negativen Temperaturkoeffizienten für den Flory und Garrett²²⁾ eine Erklärungsmöglichkeit diskutiert haben.

Die Endschmelztemperatur (final melting temperature) T_m , die allgemein bei Hochpolymeren den Schmelzpunkt der am besten geordneten Bereiche angibt und beim Tropokollagen die Temperatur darstellt, bei der die letzten Reste von nativen Eigenschaften (optische Drehung, Viskosität usw.) verschwinden, ist beim nativen und renaturierten Tropokollagen gleich (s. auch Abb. 34)^{22,23,24)}. Dies zeigt an, daß eine grundsätzliche Ähnlichkeit in der kristallinen Ordnung besteht. Der Bereich, in welchem die Denaturierung erfolgt, ist jedoch beim renaturierten Material bedeutend breiter, entsprechend seiner im Durchschnitt bedeutend schlechteren Ordnung.

Im Elektronenmikroskop wurde in eingedampften, renaturierten Lösungen in kleinen Mengen stäbchenförmige Gebilde beobachtet. Außerdem konnten aus solchen Lösungen Long-spacing Segmente der richtigen elektronenmikroskopischen Querstreifung (s. I.2) in 10 - 15 proz. Ausbeute mit ATP ausgefällt werden²⁶⁾.

In Gelatinefilmen aus kaltgegossener, hochkonzentrierter Gelatine, die einige Zeit in der Kälte gestanden hatte, konnte neben der Rückkehr der optischen Drehung auch eine Rückbildung des für das native Kollagen charakteristischen Infra-
rotspektrums beobachtet werden⁶⁶⁾.

Solche Filme zeigten sogar - im Gegensatz zu den warmgegossenen - die Rückkehr eines Röntgendiagramms, welches dem des

nativen Kollagens sehr ähnlich ist^{67,68}). Auch an Fibrillen des reifen, unlöslichen Kollagens, welche nach der Schrumpfung (= Denaturierung, s. I.4) ihr Röntgendiagramm völlig verändern, konnte man in der Kälte teilweise eine Rückkehr der für das native charakteristischen Reflexe beobachten⁶⁹). Dabei "renaturieren" gegerbte, d.h. zusätzlich vernetzte Fibrillen leichter als unvernetzte⁶⁹).

Diese schon sehr früh gemachte Beobachtung steht in guter Übereinstimmung mit der neuesten Arbeit von Altgelt et al.⁷⁰), die fanden, daß auch die im löslichen Kollagen in geringen Mengen vorhandene γ -Komponente (s. IV.2), in der die Einzelketten durch Vernetzungen verbunden sind, in der Lage ist, schnell und vollständig zu renaturieren. Veis et al.⁵⁹) (s. IV.3) fanden das Gleiche für lösliche, vernetzte Produkte, die sie aus auf milde Weise hergestellter Gelatine fraktionierten. Anscheinend bewahren allgemein die Vernetzungen das richtige Register zwischen den Ketten und bewirken so ein schnelleres und vollständigeres Wiederzusammenfinden bei der Renaturierung.

Zur Aufklärung des Mechanismus der Renaturierung haben Hip-pel und Harrington^{21,23,24}) durch die kinetische Verfolgung des Angriffes der Kollagenase auf natives und denaturiertes Tropokollagen einen wesentlichen Beitrag geleistet. Sie fanden, daß sich der Angriff dieses Enzyms auf das native Tropo-kollagen durch zwei verschieden rasche Reaktionen 1. Ordnung darstellen läßt und schlossen daraus, daß etwa 80 % der von Kollagenase angreifbaren Peptidbindungen (Pro-X $\downarrow$ Gly-Pro) schwerer zugänglich sind als der Rest. Beim Überschreiten der Denaturierungstemperatur verschwindet diese Hinderung, und die Kinetik geht in die einer gewöhnlichen Reaktion 1. Ordnung mit den Daten der vorher rascheren Reaktion über. Sobald die Denaturierungstemperatur wieder unterschritten wird, tritt augenblicklich die komplexe Kinetik des nativen Typs auf, ohne daß nach dieser Zeit die negative optische Drehung und die Viskosität schon wesentlich angestiegen wären.

Die Autoren leiten aus ihren Ergebnissen den folgenden Dreistufenprozeß der Renaturierung ab:

1. Stufe: Sofort nach Unterschreiten der Denaturierungstemperatur bilden sich in den iminosäurereichen Bereichen der Einzelketten Keime der ursprünglichen Helixkonfiguration zurück, wodurch die Änderung der enzymatischen Angreifbarkeit hervorgerufen wird.

2. Stufe: Von diesen Keimen ausgehend bildet sich auch in weiteren, größeren Bereichen der Einzelketten die Helixkonfiguration zurück, welches den Anstieg der optischen Drehung bewirkt.

3. Stufe: Die so gebildeten Einzelhelices lagern sich zu Aggregaten zusammen, die nicht unbedingt Tripelhelices sein müssen, und die Viskosität steigt dadurch an.

Über diesen dritten Schritt der Renaturierung konnten Hip-pel und Harrington nur wenig aussagen. Der Anstieg der Viskosität allein kann sowohl durch die Bildung völlig symmetrischer, jedoch großer Aggregate, durch die Bildung von Aggregaten mit teilweise starren Bereichen, z. B. mit kurzen Stücken der Tripelhelix oder durch die völlige Rückgewinnung der nativen Stäbchenform einer beschränkten Anzahl von Molekülen neben unaggregiert bleibenden Polypeptidketten erklärt werden.

Wieder erschien zur Klärung dieser Fragen die Lichtstreuung geeignet, da sich mit ihr gleichzeitig das mittlere Achsenverhältnis der Moleküle und das Gewichtsmittel des Molekulargewichts bestimmen lassen und bereits kleine Mengen stark asymmetrischer Teilchen im Renaturierungsprodukt nachweisbar sind. Im Hinblick auf den Zweistufenmechanismus der Denaturierung erschien es interessant zu untersuchen, ob die nur bis zur 1. Stufe denaturierten Tropokollagenlösungen anders renaturieren als bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturierte. Außerdem wurde der Einfluß verschiedener Denaturierungs- und Renaturierungsbedingungen auf die wieder erreichte, strukturelle Ordnung untersucht. Als Kriterium für diese erschien eine stufenweise Denaturierung der renaturierten Tropokollagenlösungen als geeignet.

VI.2 Eigene Ergebnisse

a) Verfolgung der isothermen Renaturierung mit Lichtstreuung, Viskosität und optischer Drehung

Alle Messungen zur Renaturierung wurden an sauer extrahiertem Tropokollagen (s. II.1) durchgeführt. Vor dem Beginn der Renaturierung wurde entweder bis zum Abschluß der ersten Stufe (11 Min. bei $38,0^{\circ}$) oder zur Vollendung der 2. Stufe (90 Min. bei $38,0^{\circ}$) denaturiert (s. V.6). Weiterhin sind zwei prinzipiell verschiedene Renaturierungsbedingungen zu unterscheiden. Entweder wurden die Proben in Anlehnung an Arbeiten anderer Autoren^{22,23,24)} nach der Denaturierung rasch auf 4° abgekühlt und bei dieser Temperatur belassen (isotherme Renaturierung) oder nach erstmaligem Abkühlen auf 4° für einige Zeit auf 22° erwärmt, wieder auf 4° abgekühlt und so fort (Renaturierung unter Temperaturwechsel).

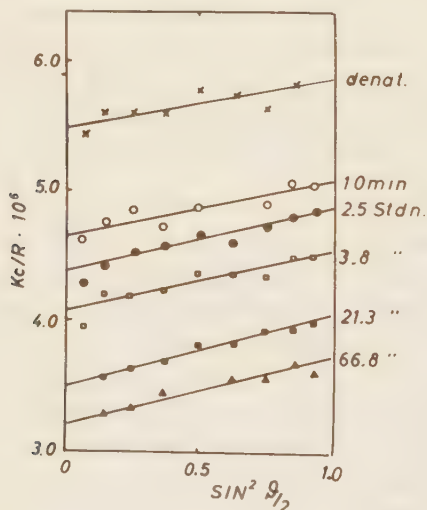


Abb. 26

Isotherme Renaturierung von bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturiertem Tropokollagen verfolgt durch die Lichtstreuung

$T = 4^{\circ} \text{ C}$; sauerextrahiertes Tropokollagen (HAc II);
 $c = 0,011 \text{ g/100 ml}$ in $0,25 \text{ m}$ Citratpuffer;
 $\text{pH } 3,7$;

Die Abb. 26 zeigt eine typische Auftragung der Lichtstreuungsmessungen die während des Stehens einer bis zur Vollendung der 2. Denaturierungsstufe denaturierten Tropokollagen-

lösung bei 4°C gemessen wurden. Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts, dargestellt durch die reziproken Ordinatenabschnitte, steigt wieder an, aber die Anfangsneigung der Kurven ($\text{tg } \alpha$) verändert sich nur wenig.

In Abb. 27 a, b, c und d sind für das gleiche Material in gleicher Weise wie bei der Denaturierung die Änderung des $\text{tg } \alpha$, des Molekulargewichts (beide aus der Lichtstreuung), der Viskosität und der optischen Drehung aufgetragen. In allen vier Diagrammen zeigt die Abszisse die Zeit vom Herunterkühlen der Proben auf 4°C bis 120 Stunden (5 Tage).

Die Anfangsneigung der Lichtstreuung, die schon auf kleine Mengen von Molekülen mit hohem Achsenverhältnis empfindlich ist, verändert sich während des Renaturierungsvorganges bei allen Konzentrationen nur wenig. Ihr Anfangswert ist etwas von der Konzentration abhängig (s. auch Abb. 17 a).

Abb. 27 a, b, c und d

Isotherme Renaturierung vollständig denaturierter Tropokollagenlösungen bei 4°C verfolgt mit Lichtstreuung, Viskosität und optischer Drehung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (HAc II) in 0,25 m Citratpuffer; pH 3,7;

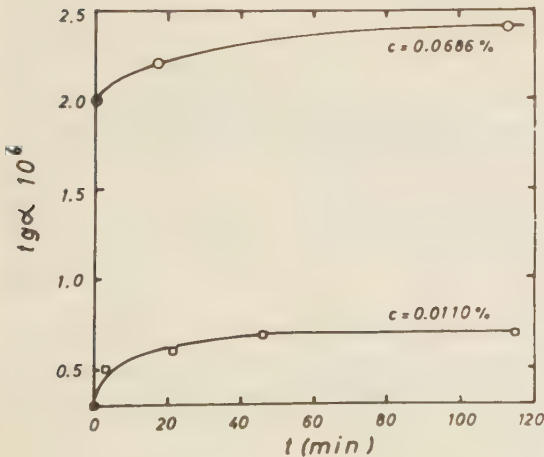


Abb. 27 a

Zunahme der Anfangs-
neigung der Winkel-
abhängigkeit der
Lichtstreuung $\text{tg } \alpha$

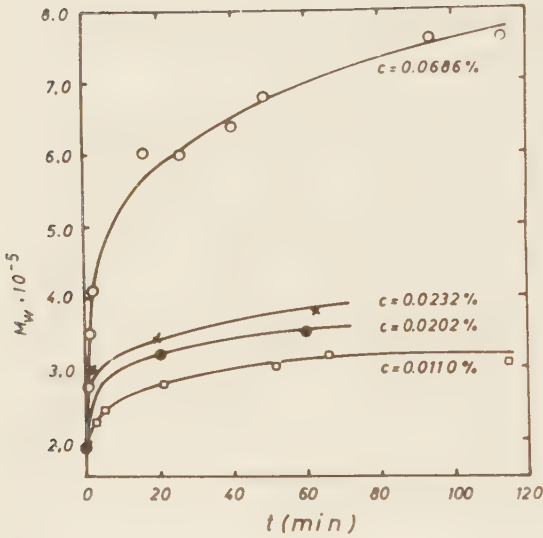


Abb. 27 b

Zunahme des Gewichtsmittels des Molekulargewichts M_w gemessen mit der Lichtstreuung

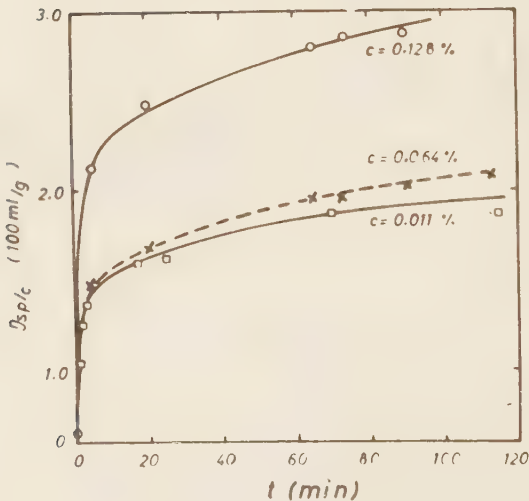


Abb. 27 c

Zunahme der reduzierten Viskosität η_{sp}/c

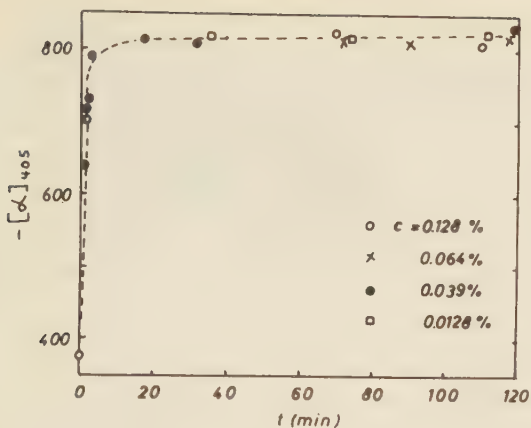


Abb. 27 d

Zunahme der negativen optischen Drehung, gemessen bei 405 mμ

Das Gewichtsmittel des Molekulargewichts steigt in starker Abhängigkeit von der Konzentration wieder an. Dabei wird bei der höchsten Konzentration ein Endwert erreicht, der weit höher als das Molekulargewicht des nativen Tropokollagens ist.

Die Viskosität nimmt mit einer ähnlichen Geschwindigkeit und Konzentrationsabhängigkeit wie M_w zu. Bei der höchsten Konzentration, bei der die Aggregation am ausgeprägtesten ist, ist dieser Anstieg hauptsächlich auf die Zunahme des Molekulargewichts und nicht auf eine zunehmende Asymmetrie zurückzuführen. Dies folgt aus der Tatsache, daß entsprechend der Staudingergleichung (Gl. 13) die Auftragung von $\log \eta_{sp}/c$ gegen die Logarithmen der zugehörigen M_w -Werte eine Gerade ergibt (Abb. 28). Die Neigung der Geraden (q in Gl. 13) ist gleich 0,8; ein charakteristischer Wert für statistische Knäuel. Die Staudingerbeziehung gilt nur, wenn sich während der Molekulargewichtserhöhung die Form der Moleküle nicht wesentlich ändert.

Die optische Drehung steigt in den ersten 10 Stunden rasch an und verändert sich danach nur noch wenig. Ihr Anstieg ist konzentrationsunabhängig.

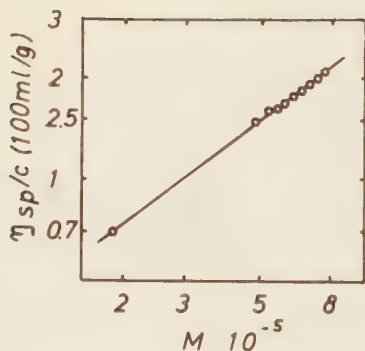


Abb. 28

Doppellogarithmische
Auftragung der η_{sp}/c -
und der zugehörigen M -
Werte während der Re-
naturierung

Werte aus Abb. 27 b und
c für $c = 0,068$ bzw.
 $0,064$ g/100 ml;

Wurde die Tropokollagenlösung nur bis zum Abschluß der 1. Stufe der Denaturierung denaturiert, so steigt die Viskosität unter sonst gleichen Bedingungen in der Kälte rascher wieder an als bei bis zum Abschluß der 2. Stufe denaturierten Lösungen (Abb. 29 a). Bei der optischen Drehung ist der Unterschied weniger groß, aber trotzdem deutlich (Abb. 29 b).

Eine Verfolgung der Renaturierung dieses nicht vollständig denaturierten Materials mit der Lichtstreuung war bisher aus experimentellen Gründen nicht möglich, da die zur Reinigung notwendige Druckfiltration bei 38° (s. II.10) mindestens eine Stunde in Anspruch nimmt und dadurch die Denaturierungszeit von 11 Min. zwangsläufig überschritten wird.

b) Renaturierung unter Temperaturwechsel von 4 auf 22° C

Um Aussagen über den Ordnungsgrad der zurückgebildeten Strukturen zu erhalten, sollte die Temperaturabhängigkeit der Denaturierung renaturierter Proben untersucht werden. Dabei zeigte sich, daß bei isothermer Denaturierung (d.h. Erwärmen der z. B. bei 4° C renaturierten Probe auf eine höhere, konstante Temperatur) die optische Drehung und die Viskosität innerhalb von 10 Min. auf einen Tiefstwert fallen (s. Abb. 30 und 31 a) und danach überraschenderweise langsam wieder ansteigen.

Abb. 29 a und b

Isotherme Renaturierung von verschieden denaturierten Tropokollagenlösungen bei 4° C verfolgt mit Viskosität und optischer Drehung

Kurve I Denaturierung nur bis zur 1. Stufe

Kurve II " bis zur Vollendung der 2. Stufe

Sauerextrahiertes Tropokollagen (HAc II) in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7;

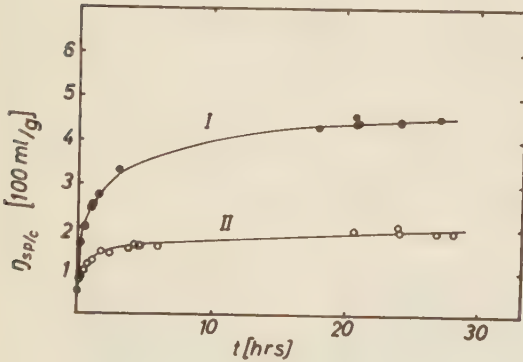


Abb. 29 a

Anstieg der Viskosität

$c = 0,058 \text{ g/100ml}$

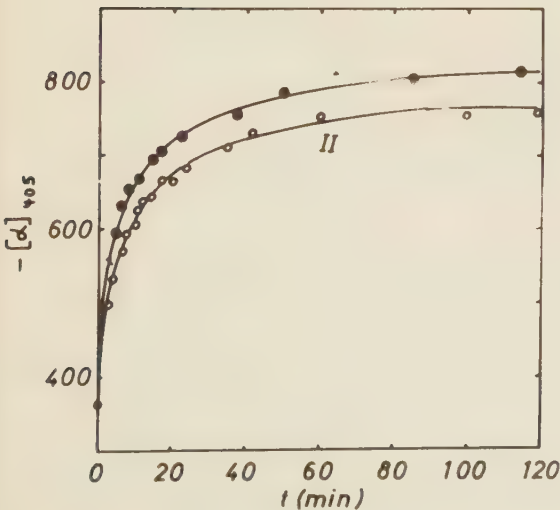


Abb. 29 b

Zunahme der negativen optischen Drehung

$c = 0,235 \text{ g/100 ml}$

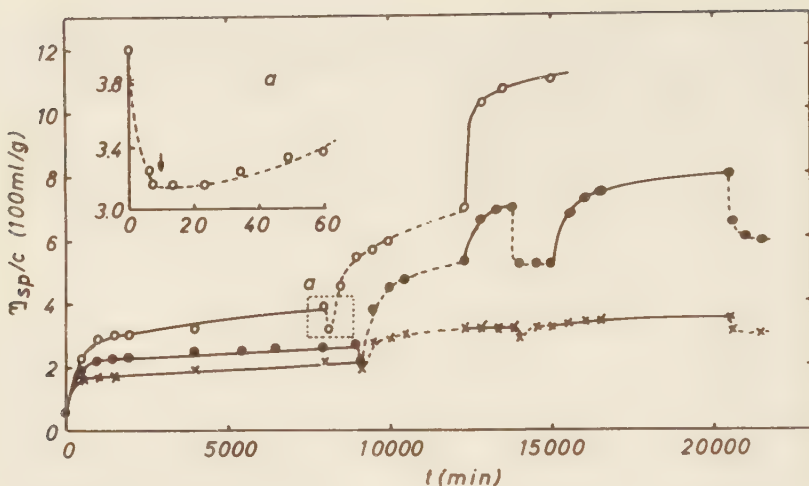


Abb. 30

Renaturierung durch abwechselndes Stehen bei 4 und 22° C; Zunahme der Viskosität

Sauer extrahiertes Tropokollagen (Cit. III), denaturiert bis zur Vollendung der 2. Stufe, in 0,25 m Citratpuffer pH 3,7;

Ausgezogene Linie: Renaturierung bei 4° C

Gestrichelte " : " " 22° C

○ c = 0,121; ● c = 0,102; × c = 0,023 g/100 ml

a) Wechsel von 4 auf 22° C, Detail;

Dieses Verhalten brachte mich auf den Gedanken, daß durch Abwechseln der Temperatur während der Renaturierung ein zusätzlicher Renaturierungs- d. h. Ordnungseffekt zu erreichen ist. Ein solches Verhalten wäre dem Auskristallisieren abgeschreckter Schmelzen beim Erwärmen vergleichbar.

Ich habe diese "Schaukelmethode" an bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturiertem Tropokollagen ausprobiert indem ich die Lösung zunächst bei 4° C, dann abwechselnd bei 22 und bei 4° so lange stehen ließ, bis die Viskosität und optische Drehung bei der jeweiligen Temperatur nur noch langsam anstiegen (s. Abb. 30 und 31). Dem schon erwähnten, raschen

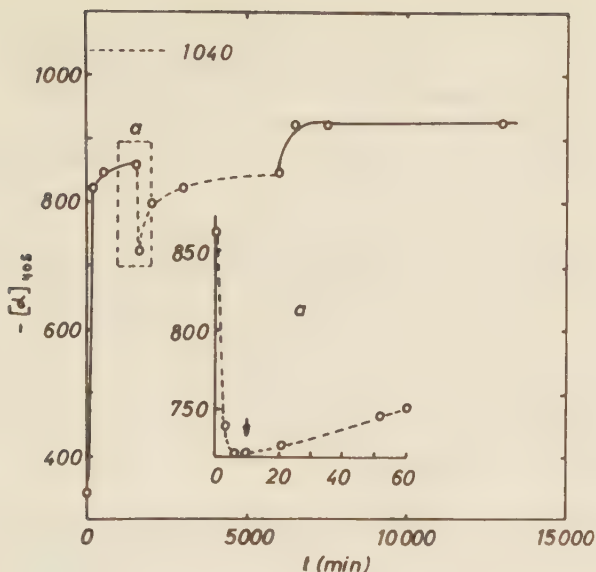


Abb. 31

Renaturierung durch abwechselndes Stehen bei 4 und 22°C
Zunahme der negativen optischen Drehung

Sauerextrahiertes Tropokollagen (Citr. III) $c = 0,235$ g/100 ml, denaturiert bis zur Vollendung der 2. Stufe in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7;

Ausgezogene Linie: Renaturierung bei 4°C;
Gestrichelte " : " " " 22°C;

a) Wechsel von 4 auf 22°C, Detail;

$[\alpha]_{405} = -1040$ ist der Wert für das native Tropokollagen;

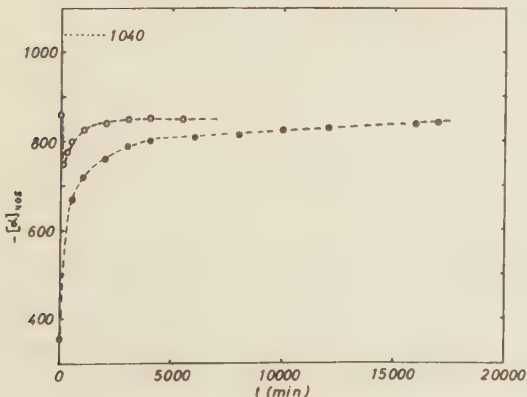


Abb. 32

Änderung d. negativen
opt. Drehung beim
Einstell. d. Temp.
auf 22°C

● sofort nach der
Denaturierung;
○ nach 24 Std. Re-
naturierung
bei 4°C; Sauer extra-
hiertes Tropokollag.
(Citr. III), $c =$
0,235 g/100 ml dena-
turiert bis zur Voll-
endung d. 2. Stufe in
0,25 m Citratpuffer,
pH 3,7;

Abfall der Viskosität und optischen Drehung nach Erhöhung der Temperatur auf 22°C folgte ein Ansteigen der Werte, wobei im Falle der Viskosität der Endwert von 4° weit überschritten wurde. Die anschließende Renaturierung bei 4°C ergab einen weiteren Anstieg, wobei nun auch bei der optischen Drehung der Endwert der ersten Renaturierung bei 4°C überschritten wird. Der Effekt ist besonders bei hohen Konzentrationen bei der Viskosität höher als bei der optischen Drehung. Er nimmt, wie zu erwarten, mit der Zahl der Schaukelschritte ab. Beginnt man mit der Renaturierung sofort bei 22°C , so steigt die optische Drehung wesentlich langsamer als bei 4°C . Der Endwert scheint jedoch der gleiche zu sein, wie bei einer Probe, die zuerst bei 4°C und anschließend bei 22°C renaturiert wurde (Abb. 32).

Erwärmt man sehr oft geschaukelte Tropokollagenlösungen, so stellen sich sowohl für die optische Drehung wie auch für die Viskosität sehr rasch für jede Temperatur Gleichgewichtswerte ein, die sich bei langem Verweilen auf dieser konstanten Temperatur selbst für lange Zeiten nicht mehr ändern. Erst bei erneuter Temperaturerhöhung fallen die Werte auf die für diese Temperatur charakteristischen Endwerte. Abb. 33 zeigt dieses Verhalten für die Viskosität. Völlig anders verhält sich eine sonst genau gleich behandelte aber nur bei der konstanten Temperatur von 4°C renaturierte Tropokollagenlösung. Hier steigt die Viskosität bei Erhöhung der Temperatur nach einem kleinen Abfall wieder an, da die Lösung den Schaukelvorgang der Renaturierung nachzuholen versucht (Abb. 33, untere Kurve). Der Effekt ist, wie zu erwarten, bei der optischen Drehung analog, jedoch kleiner.

c) Denaturierungsverhalten von verschieden denaturiertem und renaturiertem Tropokollagen

Das im vorigen Absatz beschriebene, unterschiedliche Verhalten geschaukelt und ungeschaukelt renaturierter Lösungen war bei der Messung von miteinander vergleichbaren Denaturierungskurven zu berücksichtigen. Es erschien als vernünftig, die

sich für eine Temperatur einstellenden Meßwerte nach 10 Min. langem Stehen bei dieser Temperatur (Pfeile in Abb. 30 a und 31 a) zu messen. Dadurch wird auch den ungeschaukelten Lösungen keine Zeit zur neuen Renaturierung bei dieser Temperatur gegeben.

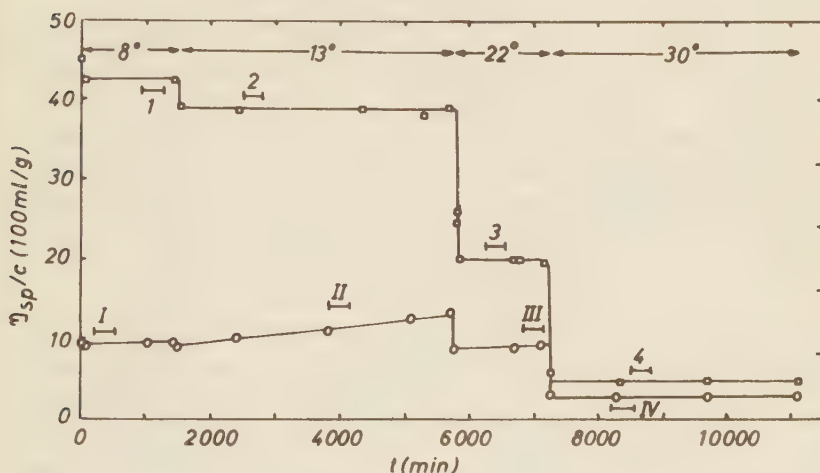


Abb. 33

Stufenweise Denaturierung von geschaukelt und ungeschaukelt renaturiertem Tropokollagen

- sauerextrahiertes Tropokollagen (Citr. III) in 0,25 m Citratpuffer pH 3,7, denaturiert bis zur Vollendung der 2. Stufe, renaturiert dreimal abwechselnd 24 Std. bei 4 und 24 Std. bei 22° C, danach 10 Tage bei 4° C; c = 0,231 g/100 ml;
- wie oben, jedoch 18 Tage bei 4° renaturiert; c = 0,254 g/100 ml;

Die mit Nummern versehenen Intervalle ---|--- zeigen den Zeitpunkt und die Dauer von an diesem Material durchgeführten Ultrazentrifugenläufen (s. Tab. VI und VII, sowie Abb. 37 und 38).

Die Abb. 34 oben, 35 und 36 a zeigen auf diese Weise gemessene Denaturierungskurven der optischen Drehung und Viskosität für verschieden denaturierte und renaturierte Tropokollagenlösungen. Die Kurven der optischen Drehung und Viskosität in Abb. 34 a und 36 a wurden parallel gemessen, indem

die Polarimeterzelle und das Viskosimeter gleichzeitig mit dem gleichen Thermostaten erwärmt wurden.

Es wurde der Einfluß einer nur bis zum Abschluß der 1. Stufe gehenden Denaturierung im Vergleich zur vollständigen Denaturierung bei gleicher Renaturierung untersucht. Außerdem sind die Denaturierungskurven gleichartig denaturierter, jedoch verschieden renaturierter Tropokollagenlösungen aufgetragen (s. Legende der Abb. 34). Zum Vergleich zeigen die Abbildungen in gleicher Weise gemessene Denaturierungskurven für natives Tropokollagen. Diese sind allerdings nicht direkt mit den anderen Kurven vergleichbar, da sich im Gegensatz zum renaturierten beim nativen Tropokollagen die Endwerte d.h. Gleichgewichtswerte für die entsprechenden Temperaturen viel langsamer einstellen (s. Abb. 21 d).

Die Abb. 34 (oben) zeigt, daß sich die Denaturierungskurve für das nur 11 Min. bei 38°C , also nur bis zur Vollendung der 1. Stufe denaturierte und anschließend durch Temperaturwechsel zwischen 4°C und 22°C renaturierte Tropokollagen (Kurve I) am besten der nativen Kurve nähert. Bei diesem Material liegt nicht nur der bei 4°C gemessene Wert für die optische Drehung am höchsten; auch der Temperatur-Bereich der Denaturierung ist hier am schärfsten. Einen größeren Denaturierungsbereich besitzt das genauso denaturierte, aber ohne Temperaturwechsel renaturierte Tropokollagen (Kurve IIa). Auf der gleichen Kurve liegen die Werte für ein bis zur Vollendung der 2. Stufe (90 Min. bei 38°C) denaturiertes Material, welches durch Wechsel der Temperatur renaturiert wurde (Kurve IIb). Eine noch größere Verteilung der thermisch zerstörbaren, optisch aktiven Konfigurationen zeigt das wie oben denaturierte und nur bei konstanter Temperatur renaturierte Tropokollagen (Kurve III). Das Denaturierungsverhalten einer nur wenige Stunden bei 4°C renaturierten, und vorher vollständig denaturierten Probe zeigt Kurve IV. Die unterschiedlichen Denaturierungsbereiche werden noch anschaulicher als durch die direkt gemessenen $[\alpha]$ nach T-Kurven durch die in Abb. 34 (unten) gezeigten $d[\alpha]/dT$ nach T-Dia-

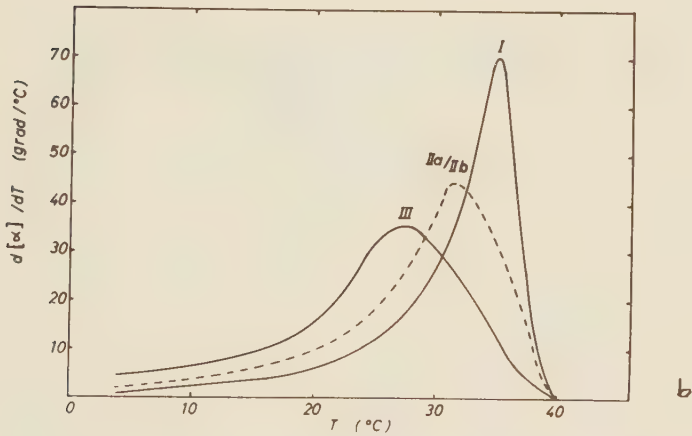
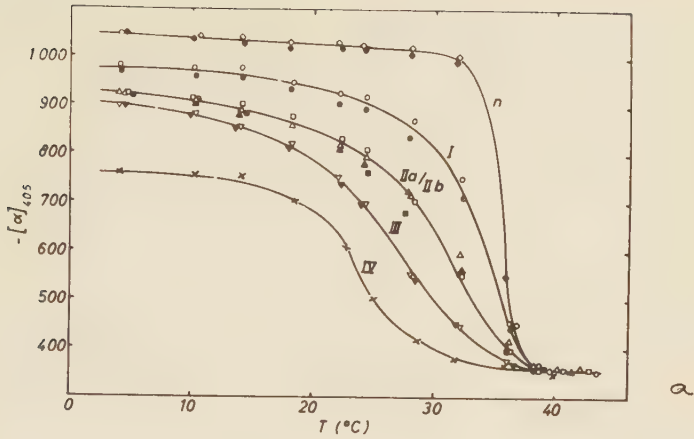


Abb. 34

Stufenweise Denaturierung verschieden denaturierter und renaturierter Tropokollagenlösungen, verfolgt mit der optischen Drehung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (Citr. III) in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7;

Legende s. nächste Seite

Zur Abb. 34:

oben: direkt gemessene Kurven; unten: Differenzierte Kurven;

Kurve	Denaturierung	Renaturierung
◇ n	n a t i v	
○ I	1. Stufe	3x abwechselnd 24 Std. bei 4° C und 24 Std. bei 22°, danach 6 Tage bei 4°
Δ IIa	1. Stufe	12 Tage bei 4° C
□ IIb	1. und 2. Stufe	3x abwechselnd 24 Std. bei 4° C und 24 Std. bei 22°, danach 6 Tage bei 4°
▽ III	"	12 Tage bei 4° C
x IV	"	4 Std. bei 4° C

offene Punkte: c = 0,238 g/100 ml

geschlossene Pkt. c = 0,060 g/100 ml

Die optischen Drehungen wurden gleichzeitig mit den Viskositäten der Abb. 36 a gemessen.

gramme, die aus ersteren durch graphische Differenzierung mit der Spiegelmethode (ein senkrecht auf die Papierebene gestellter, rechteckiger Spiegel wird so gehalten, daß sich in ihm die Kurve ohne Knick als gespiegelte Kurve fortsetzt. Die am Spiegel entlang gezogene Gerade ist die Normale der Kurve im Schnittpunkt der Spiegelfläche mit der Kurve. Der reziproke Anstieg der Normalen ist die 1. Ableitung der Kurve.), erhalten wurden, dargestellt. Hier gibt die Ordinate direkt die bei der Temperatur T pro °C verlorengelassene optische Drehung an. Dieser Wert ist proportional der Zahl der pro °C zerstörbaren, optisch aktiven Konfigurationen der zurückgebildeten, kollagenähnlichen Struktur. Man erkennt, daß sich das Maximum der thermisch labilen Konfigurationen in der Reihenfolge der Kurven III, II und I zu höheren Temperaturen ($T_{\max}$ -Werten, s. unten) verschiebt und daß sich die Breite der Verteilung in der gleichen Reihenfolge verkleinert d.h. die konfigurative Ordnung wächst.

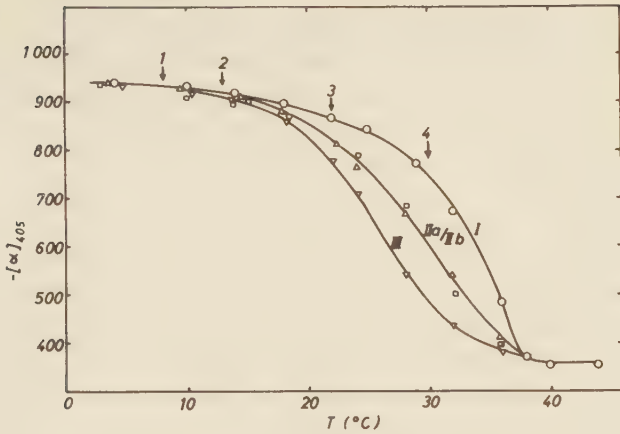


Abb. 35

Stufenweise Denaturierung verfolgt mit der optischen Drehung an verschieden denaturierten und renaturierten Tropokollagenlösungen, die bis zum Erreichen gleicher Endwerte renaturiert wurden

Material und Puffer s. Abb. 34

Kurve	c (g/100 ml)	Denaturierung	Renaturierung
○ I	0,236	1. Stufe	3x abwechselnd 24 Std. bei 4° und 24 Std. bei 22°, danach 2 Tage bei 4° C
Δ IIa	0,254	"	36 Tage bei 4°C
□ IIb	0,231	1. und 2. Stufe	wie unter I
▽ III	0,254	"	36 Tage bei 4°C

Die Pfeile mit Nummern geben die Temperaturen an, bei denen das Material I in der Ultrazentrifuge untersucht wurde (s. Tab. VII und Abb. 38).

Die Konzentration, die während der Denaturierung, Renaturierung und anschließender stufenweisen Denaturierung herrschte, hat auf die Denaturierungskurven der optischen Drehung keinen Einfluß. Alle Kurven wurden an Lösungen mit $c = 0,23$ und $0,06$ g/100 ml gemessen und eine sehr gute Übereinstimmung gefunden (s. Abb. 34).

In Abb. 35 sind ähnliche Denaturierungskurven wie in Abb. 34 aufgetragen, nur daß hier auch die bei konstanter Temperatur renaturierten Proben so extrem lange (36 Tage) bei 4°C aufbewahrt wurden, daß sie die 4°C -Werte der optischen Drehung des geschaukelten Materials erreichten. Die Abbildung zeigt, daß sich die verschieden denaturierten und renaturierten Tropokollagenlösungen in der Verteilungsbreite der thermolabilen, optisch aktiven Konfigurationen genau wie die in Abb. 34 vermessenen Lösungen unterschieden, obwohl die Anfangswerte der Denaturierungskurven jetzt gleich sind.

Abb. 36 zeigt im Vergleich zu der Abnahme der optischen Drehung in Abb. 34 die, wie erwähnt, gleichzeitig gemessene Viskositätsabnahme während der stufenweisen Denaturierung. Die Viskositätskurven sind nicht so einfach vergleichbar wie die Kurven der optischen Drehung, da die Meßgröße selbst stark konzentrationsabhängig ist (s. II.12). So mußten die Messungen bei der höheren Konzentration (Abb. 36 a) und an der niedrigeren Konzentration (Abb. 36 c) in verschiedenen Maßstäben aufgetragen werden.

Außerdem fällt aber auf, daß sich auch bei gleicher Konzentration die 4°C -Werte (Endwerte der Renaturierung = Anfangswerte der stufenweisen Denaturierung) unterscheiden. Bei der höheren Konzentration von $0,23$ g/100 ml (Abb. 36 a) liegt der 4°C -Wert für das bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturierte und durch Temperaturwechsel renaturierte Material am höchsten (Kurve IIb). Dieses Material zeigt jedoch eine bedeutend breitere Verteilung des Viskositätsabfalls - siehe auch die der Abb. 34 b analoge Auftragung der Abb. 36 b - als das genauso renaturierte aber nur bis zum Abschluß der

Abb. 36 a, b, c und d

Stufenweise Denaturierung verschieden denaturierter und renaturierter Tropokollagenlösungen verfolgt mit der Viskosität

Material wie in Abb. 34

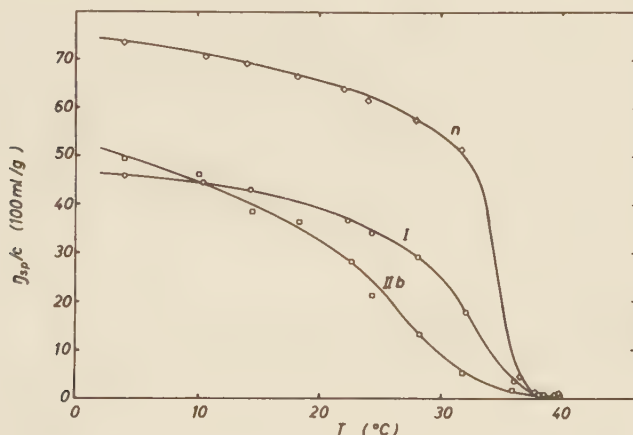


Abb. 36 a

Direkt gemessene Kurven

Punkte und Kurvenbezeichnungen s. Abb. 34 ; $c = 0,238$ g/100 ml; Die Viskositäten wurden gleichzeitig mit den optischen Drehungen der Abb. 34 gemessen.

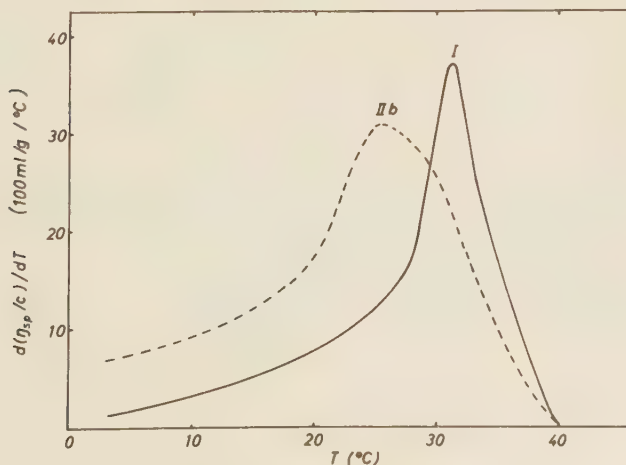


Abb. 36 b

Differenzierte Kurven der Abb. 36 a

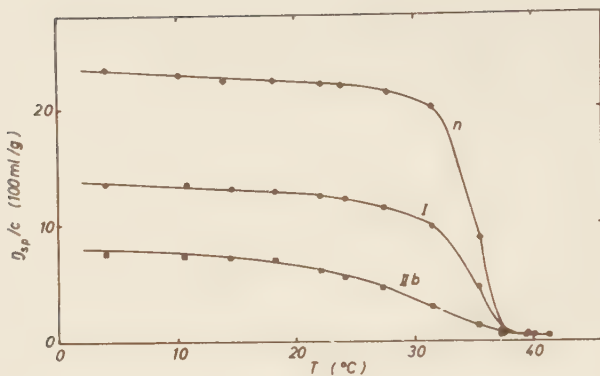


Abb. 36 c

Direkt gemessene Kurven wie Abb. 36 a
jedoch $c = 0,060$ g/100 ml

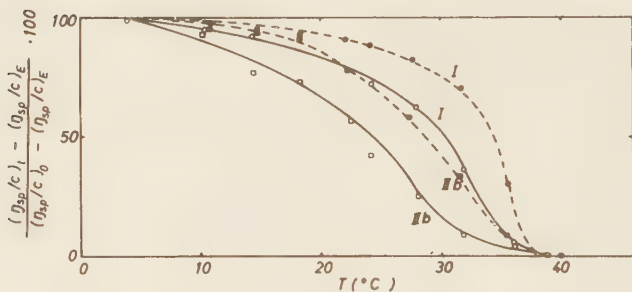


Abb. 36 d

Prozentuale Auftragung der Kurven aus Abb. 36 a
und Abb. 36 c

- aus Abb. 36a; $c = 0,238$ g/100 ml
 ---- aus Abb. 36c; $c = 0,060$ g/100 ml

Die Indices bedeuten: o Anfangswert
 E Endwert
 t zur Zeit t gemessen

1. Stufe denaturierte Tropokollagen (Kurve I). Bei der niedrigeren Konzentration von 0,06 g/100 ml hat sich die Reihenfolge der 4°C -Werte umgekehrt und Kurve II b hat sogar nur noch den halben Anfangswert von Kurve I (Abb. 36 c).

Es sei daran erinnert, daß die Viskosität sowohl auf Veränderungen der Achsenverhältnisse, wie auch auf Aggregationen anspricht. Die bei der Renaturierung durch Temperaturwechsel beobachteten, großen Viskositätszunahmen beruhen sicher auf beiden Effekten. Im allgemeinen wird durch hohe Konzentrationen die Aggregation begünstigt, so daß dort dasjenige Material große Endwerte der Renaturierung erreicht, welches eine große Aggregationsneigung besitzt (s. auch Diskussion VI.3).

Bei beiden Konzentrationen ist die Verteilungsbreite des Viskositätsabfalls in Übereinstimmung mit den Kurven der optischen Drehung bei dem bis zum Abschluß der 2. Stufe denaturierten Tropokollagen größer als bei dem nur bis zum Abschluß der 1. Stufe denaturierten. Die Schärfe der Verteilung und ihre Lage hängt jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der optischen Drehung von der Konzentration ab. Zum besseren Vergleich sind in Abb. 36 d die Werte der Abb. 36 a und c prozentual bezogen auf die Gesamtdifferenz von $(\eta_{sp}/c)_0$ bei 4°C und $(\eta_{sp}/c)_{\infty}$ im denaturierten Zustand aufgetragen. Die Abbildung zeigt, daß die Temperaturverteilung der Denaturierung bei der höheren Konzentration (ausgezogene Linien) größer ist, als bei der niedrigeren Konzentration (gestrichelte Linien). Die Temperatur ($T_{\max}$), bei der der maximale Verlust an optischer Drehung, bzw. Viskosität pro Temperatureinheit auftritt, wird bei der Viskosität durch Konzentrationserhöhung erniedrigt. Diese Temperatur wird bei den direkt gemessenen Kurven durch den Wendepunkt und bei den differenzierten durch das Maximum gegeben.

Da die $T_{\max}$ -Werte als Maß für den Ordnungszustand der rückgebildeten Strukturen angesehen werden können, wurden sie für die verschieden gut renaturierten Proben (s. Legende der Abb. 34 und 35), gemessen mit der optischen Drehung und Viskosität, zusammengestellt:

	Kurve I	IIa	IIb	III
Optische Drehung				
Abb. 34, $c=0,06$ g/100 ml	35°C	31°C	31°C	27°C
Optische Drehung				
Abb. 34, $c=0,23$ g/100 ml	35	31	31	27
Optische Drehung				
Abb. 35, $c=0,25$ g/100 ml	36	30	30	26
Viskosität				
Abb. 36 a und b, $c = 0,06$ g/100 ml	36	-	31	-
Viskosität				
Abb. 36 c, $c = 0,23$ g/100 ml	33,5	-	26	-

Die Werte der ersten vier Reihen dieser Aufstellung stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Das Maximum der Abnahme von optischer Drehung und Viskosität ist demnach gleich, wenn die Renaturierung bei der niedrigen Konzentration stattgefunden hat. Bei höherer Konzentration renaturiertes Tropokollagen zeigt eine breitere Verteilung der Viskositätsabnahme (Abb. 36c) und ein niedrigeres $T_{\max}$, während sich diese Daten bei der optischen Drehung nicht ändern.

d) Ultrazentrifugenuntersuchungen an renaturiertem Tropokollagen

Alle bisher beschriebenen Untersuchungen haben Mittelwerte der Eigenschaften des renaturierten Tropokollagens geliefert. Mit der Ultrazentrifuge kann man im Renaturierungsprodukt

eventuell auftretende Einzelkomponenten beobachten, wenn sich diese in ihrem Sedimentationsverhalten unterscheiden.

Die Tropokollagenlösungen, welche entweder bis zum Abschluß der 1. Stufe oder vollständig denaturiert worden waren, wurden sowohl durch einfaches Stehen bei 4°C wie auch durch Temperaturwechsel zwischen 4°C und 22°C renaturiert. Das so erhaltene, renaturierte Tropokollagen wurde bei verschiedenen Temperaturen in der Ultrazentrifuge untersucht. Dazu wurden die Lösungen vor dem Einfüllen in die Ultrazentrifugen- zelle längere Zeit auf der späteren Arbeitstemperatur der Ultrazentrifuge gehalten. Das Verhalten der vollständig denaturierten Proben zeigt Abb. 33. Bei dem geschaukelten Tropokollagen stellten sich dabei, wie erwähnt (VI.2b), Gleichgewichtszustände für die verschiedenen Temperaturen ein. Der Zeitpunkt der Ultrazentrifugenuntersuchung ist mit den Versuchsnummern 1 - 4 in der Abb. 33 markiert. Dabei gibt die Länge der darübergezeichneten Balken die Dauer der Ultrazentrifugenläufe an. Wichtiger als beim geschaukelten sind diese Angaben (Versuchsnummern I - IV) für das bei konstanter Temperatur renaturierte Tropokollagen, welches sich mit der Zeit auch bei konstanter Temperatur verändert. Die optischen Drehwerte unmittelbar vor Beginn der Ultrazentrifugenläufe sind für das geschaukelte Material der Kurve I der Abb. 33 (Pfeile mit Versuchsnummern) zu entnehmen. Für das einfach renaturierte Tropokollagen sind sie in Tabelle VI enthalten.

Die Abb. 37 zeigt das Aussehen der Sedimentationsdiagramme für das vollständig denaturierte und bei konstanter Temperatur renaturierte Tropokollagen bei verschiedenen Temperaturen. In Tabelle VI sind die dazugehörigen Sedimentationskoeffizienten mit den übrigen Daten der Versuche zusammengestellt.

Bei den bei $8,8^{\circ}\text{C}$ und $14,1^{\circ}\text{C}$ durchgeführten Läufen trat im weiteren Verlauf der Sedimentation ein dauernder Wechsel des Aussehens des Sedimentationsdiagramms auf, ein Zeichen dafür,

Tab. VI.

Ultrazentrifugenuntersuchung von vollständig denaturiertem und
isotherm renaturierten Tropokollagen.

Vers. Nr.	Vor dem Lauf		In der Ultrazentrifuge			
	T (°C)	η_{sp}/c (100 ml/g)	$-\alpha]_{405}$	T (°C)	Bild	$S_{20,w} \cdot 10^{13}$ H x n
I	8.0	9.2	~ 930	8.8	37, I	~ 11 - -
II	13.0	11.2	~ 920	14.1	II	~ 8 - -
III	22.0	9.2	~ 825	20.9	III	- 3.67 2.72
IV	30.0	2.6	~ 600	30.0	IV	- 3.10 2.70

Sauer extrahiertes Tropokollagen (Citr. III), $c = 0.254$ g/100 ml in 0.25 m Citratpuffer, pH 3.7. Bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturiert und 18 Tage bei 4° C renaturiert, s. dazu Abb. 37. Erklärung der Symbole s. VII.

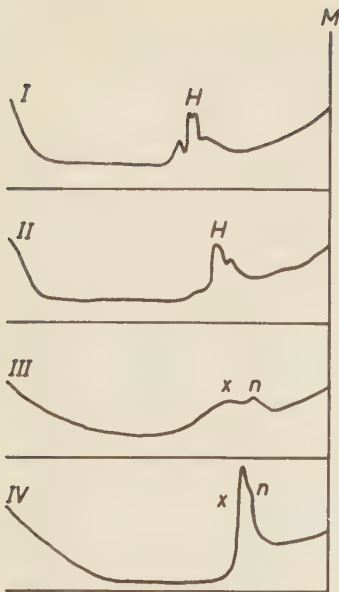


Abb. 37

Ultrazentrifugenuntersuchung von vollständig denaturiertem und isotherm bei 4°C renaturiertem Tropokollagen bei verschiedenen Temperaturen

Sauerextrahiertes Tropokollagen (Citr. III), $c = 0,254 \text{ g/100 ml}$ in $0,25 \text{ m}$ Citratpuffer, $\text{pH } 3,7$, denaturiert bis zur Vollendung der 2. Stufe, renaturiert 18 Tage bei 4°C .

I	$T = 8,8^\circ \text{C}$	$t = 4850 \text{ sec}$
II	$= 14,1$	$= 4510$
III	$= 20,9$	$= 7210$
IV	$= 30,0$	$= 8220$

Die Zeit t rechnet vom Erreichen der Endumdrehungszahl von 50150 UPM. M = Meniskus; Vortemperatur und weitere Daten s. Tab. VI;

daß sich das System während der Sedimentation veränderte. Dies kann durch drei Gründe erklärt werden: 1) Das bei konstanter Temperatur renaturierte Tropokollagen befand sich auch vor der Sedimentation nicht völlig im Gleichgewicht. 2) Aus experimentellen Gründen stellte sich in der Ultrazentrifuge oft eine etwas andere Temperatur als die der Vortemperatur ein. Dadurch verändert sich das Material entsprechend der neuen Temperatur während des Laufes. 3) durch die Sedimentation werden lose Aggregate zerstört, die sich während des Laufes wieder zu vereinen suchen.

Aus diesem Grunde konnten die verschiedenen Komponenten der Abb. 37, Versuch I und II nicht weiter untersucht werden. Es wurde nur der Sedimentationskoeffizient des Hauptpeaks H, der während des ganzen Laufes bestehen blieb, bestimmt. Dieser ist mit $11,7 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ (Versuch I), bzw. $8 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ (Versuch II) weit größer als der des nativen Tropokollagens oder der einzelnen Komponenten α , β oder γ . Zur Entkräftigung

des möglichen Einwandes, daß auch das native Tropokollagen bei tiefen Temperaturen ähnlich sedimentierende Aggregate bildet, wurde mit diesem ein Lauf bei 8°C durchgeführt. Dabei zeigte sich der normale, ultrascharfe Peak mit $s_{20,w}^0 = 3 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ des nativen Tropokollagens.

Bei $20,9^{\circ}\text{C}$ (Vorwärmtemperatur 22°C) zeigte sich ein völlig anderes Bild (Abb. 37, Versuch III). Ein kleiner, während der ganzen Versuchsdauer scharf bleibender Peak (Bezeichnung: n) wanderte hinter einem sich stark verflachenden, größeren Peak (Bezeichnung: x). Letzterer besitzt einen Sedimentationskoeffizienten, der etwa in der Mitte zwischen α und β liegt. Eine Trennung dieser beiden Komponenten ist auch für das ursprüngliche, denaturierte Tropokollagen bei dieser niedrigen Konzentration nicht zu erwarten, da die Gipfel zur Zeit der Trennung schon zu flach sind. Der Sedimentationskoeffizient der langsameren n-Komponente wurde zusammen mit den Ergebnissen weiterer Versuche (s. Tab. VI und VII) in Abb. 40 aufgetragen. Diese Auftragung beweist eindeutig, daß es sich bei der n-Komponente um ein Material handelt, welches zumindest in seinem Sedimentationsverhalten mit dem nativen Tropokollagen völlig identisch ist.

Die oben für die Sedimentation bei 8 bzw. 13°C geschilderten Komplikationen treten bei 22°C nicht mehr auf. Dies weist darauf hin, daß sich das System in bezug auf sein Sedimentationsverhalten bei dieser Temperatur im Gleichgewicht befindet.

Das Bild hat sich im Prinzip auch bei 30°C (Abb. 37, Versuch IV) nicht geändert. Die Peaks n und x liegen etwas näher zusammen, was jedoch durch die Uneinheitlichkeit des letzteren erklärt werden kann.

Ganz analog zu diesem Versuch sind die Ultrazentrifugenuntersuchungen an dem gleichfalls vollständig denaturierten, aber durch Abwechslung der Temperatur zwischen 4 und 22°C renaturierten Material in Abb. 38 und Tabelle VII dargestellt.

Ultrazentrifugenuntersuchungen von vollständig denaturiertem und unter
Temperaturwechsel renaturierten Tropokollagen.

c = 0.231 g/100 ml

Vers. Nr.	Vor dem Lauf		In der Ultrazentrifuge			
	T (°C)	η_{sp}/c (100 ml/g)	$-\alpha_{405}$	T (°C)	Bild	$S_{20,w} \cdot 10^{13}$ H x n (sec)
1	8	42.4	930	8	38, 1	7.3 - -
2	13	39.0	915	15	2	5.3 - 2.9
3a	22	20.0	850	21.1	3	- 4.12 2.68
3b				20.9	-	- 3.67 2.72
3c				22.0	-	- 4.15 2.98
4	30	4.8	200	30.0	4	- 3.11 2.62

c = 0.115 g/100ml

5	22	8.7	850	20.9	-	- 3.81 3.03
---	----	-----	-----	------	---	-------------

Sauerextrahiertes Tropokollagen (Citr. III), c = 0.231 und 0.115 g/100 ml in 0.25 m Citratpuffer, pH 3.7. Bis zur Vollendung der 2. Stufe denaturiert und 3 mal abwechselnd 24 Stdn. bei 4° C und 24 Stdn. bei 22° C sowie anschließend 10 Tage bei 4° renaturiert. S. dazu Abb 38. Erklärung der Symbole s. VII.

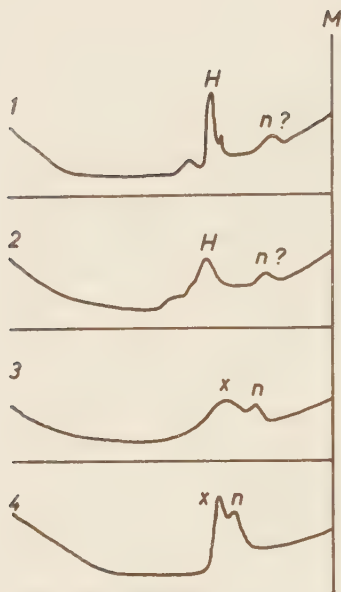


Abb. 38

Ultrazentrifugenuntersuchung
von vollständig denaturier-
tem und unter Temperatur-
wechsel renaturiertem Tropo-
kollagen bei verschiedenen
Temperaturen

Sauer extrahiertes Tropokollagen (Citr. III), $c = 0,231 \text{ g/100 ml}$ in $0,25 \text{ m}$ Citratpuffer, pH 3,7, denaturiert bis zur Vollendung der 2. Stufe, renaturiert $3 \times$ abwechselnd 24 Std. bei 4° und 24 Std. bei 22° , danach 10 Tage bei 4°C ;

1	$T = 8,0^\circ \text{C}$	$t = 8050 \text{ sec}$
2	15,0	7370
3	22,0	7650
4	30,0	8030

t und M s. Abb. 35; Vortemperaturierung und weitere Daten s. Tab. VII;

Hier treten bei 8 und 15°C (Vorwärmtemperaturen: 8 und 13°C) (Versuche 1 und 2) wieder ähnliche Störungen, wie bei den entsprechenden Versuchen I und II beim einfach renaturierten Tropokollagen auf. Die Sedimentationskoeffizienten des Hauptpeaks H sind mit $7,3 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ (Versuch 1) und $5,3 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$ (Versuch 2) merklich kleiner als beim bei konstanter Temperatur renaturierten Material. An dieser Stelle sei daran erinnert, daß kleinere Sedimentationskoeffizienten nicht gleichbedeutend mit niedermolekularen Aggregaten sind. Z. B. besitzt das native Tropokollagen mit seinem hohen Achsenverhältnis bei einem Molekulargewicht von 350000 eine Sedimentationskonstante von $3 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$. und das fast kugelsymmetrische Hämoglobin bei einem Molekulargewicht von 68000 eine Sedimentationskonstante von $6,3 \cdot 10^{-13} \text{ sec}$. Eine Verkleinerung der Sedimentationskonstanten kann sowohl durch eine Abnahme des Molekulargewichts, wie auch durch eine Zunahme der Asymmetrie verursacht sein. Als weiterer Unterschied gegenüber den gleichartigen Versuchen an einfach renaturier-

tem Material tritt hier anscheinend schon bei tieferen Temperaturen die n-Komponente auf.

Die Versuche bei 22°C (Nr. 3) und bei 30°C (Nr. 4) sind von den Versuchen Nr. III und Nr. IV kaum zu unterscheiden. Das gleiche Bild zeigte auch ein Versuch bei 22°C (Nr. 3a), bei dem als einziger Unterschied zum Versuch 3 die Konzentration während der Renaturierung nur 0,115 g/100 ml statt 0,230 g/100 ml betrug. Die anscheinend völlige Gleichartigkeit des Sedimentationsverhaltens der geschaukelt und ungeschaukelt renaturierten Proben bei höheren Temperaturen (22 und 30°C) ist überraschend, da auch bei diesen Temperaturen noch erhebliche Unterschiede in der Viskosität und optischen Drehung der Proben vor dem Lauf bestanden (s. Tab. VI und VII).

Eine sehr interessante Frage war die nach dem ungefähren, prozentualen Anteil der gebildeten n-Komponente an der Gesamtmenge. In den Abb. 37 und 38 erscheint die Fläche der langsameren n-Komponente durch den Einfluß der kurz vor ihr wandernden Komponente ähnlich wie bei der Trennung von α und β (s. IV.2) stark vergrößert. Eine exakte Eliminierung dieses Johnston-Ogston Effektes wie sie bei der α - β Trennung durchgeführt worden war, scheiterte bei diesen Versuchen daran, daß die Renaturierungsversuche zu Verhinderung der Gelierung bei vergleichsweise niedrigen Konzentrationen

(0,23 g/100 ml) durchgeführt worden waren. Bei der doppelten Verdünnung (0,115 g/100 ml) ist eine Ausmessung der Flächen gerade noch möglich, doch genügt dieser kleine Konzentrationsbereich nicht für eine exakte Extrapolation auf Null. Außerdem ist nicht ausgeschlossen, daß in der renaturierten Lösung während der Verdünnung eine Änderung des Aggregationszustandes auftritt. Eine grobe Extrapolation (Abb. 39) ergibt einen wahren Anteil an n-Komponente von 8 - 14 %. Zum Vergleich ist die aus Abb. 15 entnommene Konzentrationsabhängigkeit der Fläche des ebenfalls langsamsten α -Peaks im Gemisch mit β aufgetragen (ausgezogene Linie), um zu zeigen, daß die Neigung der getroffenen Extrapolation in einer vernünftigen Größenordnung liegt.

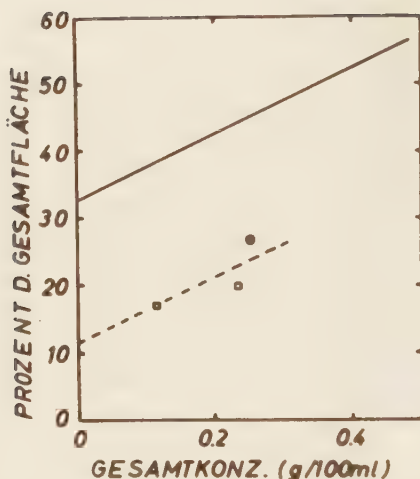


Abb. 39

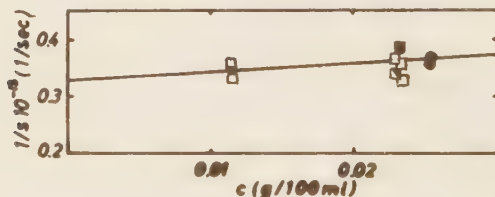
Abschätzung des wahren, prozentualen Anteils der n-Komponente aus den Flächen der Ultrazentrifugen-peaks

Ausgezogene Linie: Eliminierung des Johnston-Ogston Effektes bei der α -Komponente (aus Abb. 15);

Gestrichelte Linie: Dazu parallele Linie durch die Punkte, welche die gemessenen Flächenanteile der n-Komponente bei der Konzentration c darstellen.

○ Versuch III aus Tab. VI

□ Versuche 3a und 5 aus Tab. VII



Die langsamste Komponente wird in ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit von den übrigen Komponenten einer Mischung nicht beeinflusst. Deshalb ist es berechtigt, zur Ermittlung ihrer wahren Konzentrationsabhängigkeit die Sedimentationskoeffizienten der n-Komponente (Tab. VI und VII) gegen die Konzentration aufzutragen, in der diese in der Mischung enthalten ist. In Abb. 40 sind die reziproken Sedimentationskoeffizienten gegen 10 % der Gesamtkonzentration an renaturierten Tropokollagen aufgetragen. Die ausgezogene Linie stellt die Konzentrationsunabhängigkeit der reziproken Sedimentationskoeffizienten für das native Material dar (entnommen aus Abb. 8 a). Die Punkte liegen sehr gut auf dieser Geraden. Dadurch wird bewiesen, daß die n-Komponente zumindest in ihrem Sedimentationsverhalten völlig mit dem nativen Tropokollagen identisch ist. Diese Schlußfolgerung wird nicht berührt durch die für die Auftragung der Abb. 40 gemachte ungenaue Annahme, daß der Anteil der n-Komponente 10 % beträgt. Auch die Auftragung gegen die Gesamtkonzentration hätte auf Null extrapoliert die gleiche Sedimentationskonstante ergeben, nur wäre die Steilheit der Geraden eine andere. Die so erhaltene, falsche Konzentrationsabhängigkeit der Sedimentationskoeffizienten hätte natürlich auch nicht der des nativen, alleinsedimentierenden Tropokollagens entsprochen. Umgekehrt gibt aber die Tatsache, daß unter der gemachten Annahme eines 10 %igen Anteils die richtige Konzentrationsabhängigkeit erhalten wird, einen Hinweis darauf, daß diese Zahl ungefähr richtig ist.

Das nur bis zum Abschluß der ersten Stufe denaturierte und unter Abwechseln der Temperatur renaturierte Tropokollagen zeigt in der Ultrazentrifuge bei 22° C einen großen n-Peak neben wenig x-Komponente (Abb. 41 a). Zum Vergleich wurde unter den gleichen Bedingungen eine genauso renaturierte, aber vorher vollständig denaturierte Probe untersucht (Abb. 41 b).

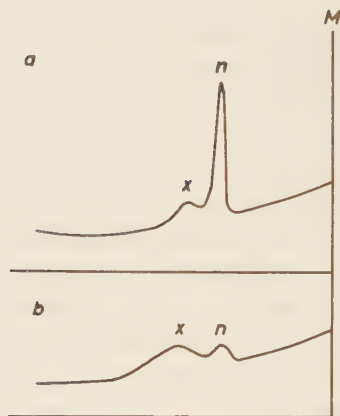


Abb. 41

Unterschiedliche Mengen an n-Komponente bei nur bis zur Vollendung der 1. Stufe denaturiertem und vollständig denaturiertem Tropokollagen nach gleicher Renaturierung

Sauer extrahiertes Tropokollagen (Citr. III), c = 0,231 g/100 ml in 0,25 m Citratpuffer, pH 3,7; T = 22°C; Aufnahme 7870 sec nach Erreichen der Endumdrehungszahl von 59690 UPM; M = Meniskus;

a) Denaturiert bis zur Vollendung der 1. Stufe, renaturiert 3x abwechselnd 24 Std., bei 4° und 24 Std. bei 22°, danach 12 Tage bei 4°.

b) Vollständig denaturiert, renaturiert wie oben.

e) Ausfällung von Fibrillen und Long-spacing-Segmenten aus ~~renaturierten~~ Tropokollagenlösungen

Zur Ausfällung der Fibrillen wurde zunächst gegen Phosphatpuffer pH 7,0; $\mu = 0,1$ (1-2 Tage) und anschließend gegen Leitungswasser (2-3 Tage) bei 4° dialysiert. Zur Fällung der Long-spacing-Segmente mußte gegen 0,05 proz. Essigsäure umdialysiert werden. Daraus wurden die Segmente durch Dialyse der Kollagenlösung gegen eine auf pH 3,5 eingestellte 0,4 proz. ATP-Lösung ausgefällt.

Bei dem vollständig denaturierten und 7 Tage isotherm bei 4° renaturierten Material zeigte sich bei der Dialyse gegen

Phosphatpuffer nur ein geringer Niederschlag. Erst bei der anschließenden Dialyse gegen Wasser fielen etwa 85 % des Materials aus. Im Elektronenmikroskop beobachtet man sehr dünne, kontrastarme, jedoch strukturierte Fibrillen des nativen Typs. Daneben zeigt sich aber ein erheblicher Teil an unstrukturiertem Material. Die Menge des strukturierten Anteils läßt sich nur schwer ermitteln. Die Schätzungen liegen zwischen 20 und 40 %. Die aus diesen Lösungen mit ATP gefällten Anteile (Ausbeute ca. 80 %) zeigen wenig gut strukturierte Segmente. Deren Anteil läßt sich auf etwa 10 bis 20 % schätzen.

Das nur bis zum Abschluß der ersten Stufen denaturierte und unter Temperaturwechsel renaturierte (3x abwechselnd 24 Std. bei 4° und 24 Std. bei 22°) Tropokollagen, welches nach seinen Denaturierungsverhalten (Abb. 34) und dem Bild in der Ultrazentrifuge (Abb. 41) am weitgehendsten renaturiert ist, liefert Fibrillen und Segmente, die weder im Aussehen noch in der Ausbeute (etwa 90 %) von denen aus nativen Lösungen unterscheidbar sind. Hier fiel auch fast das gesamte Material bei der Dialyse gegen Phosphatpuffer aus.

Zwischen diesen beiden Extremen des am schlechtesten und am besten renaturierten Tropokollagens liegen auch, was ihre Fähigkeit zur Bildung von Fibrillen und Segmenten betrifft, die vollständig denaturierten und unter Temperaturwechsel renaturierten und die nur bis zur Vollendung der ersten Stufe denaturierten und isotherm renaturierten Lösungen.

Qualitativ steigt die Ausbeute an gut strukturierten Fibrillen und Segmenten mit der Zunahme von $T_{\max}$ und der Abnahme der Verteilungsbreite der Denaturierungskurven in Abb. 34. Quantitative Aussagen sind mit Hilfe des Elektronenmikroskops schwierig zu treffen, doch scheint die Ausbeute an strukturiertem Material in allen Fällen höher zu liegen, als die vor der Ausfällung in der Lösung festgestellten Mengen an Tropokollagen des nativen Typs (n-Komponente).

VI.3 Diskussion

Da die optische Drehung und die Viskosität entsprechend dem negativen Temperaturkoeffizienten der Renaturierung bei tiefen Temperaturen einen schnelleren Anstieg zeigen als bei höheren, wurde von Harrington und Hippel und zunächst auch von mir angenommen, daß das Stehen der denaturierten Tropokollagenlösungen bei möglichst niedrigen Temperaturen zur weitgehendsten Renaturierung führt. Aus diesem Grunde und da die dritte Stufe des von Harrington und Hippel vorgeschlagenen Mechanismus der Renaturierung (s. VI.1) näher untersucht werden sollte, wurden die ersten Untersuchungen an vollständig denaturierten und nach raschem Abkühlen isotherm bei 4° C renaturierten Tropokollagenlösung durchgeführt.

Mit Hilfe der zusätzlichen Informationen, die aus der Verfolgung des Renaturierungsvorganges mit der Lichtstreuung gewonnen wurden, kann das Bild der obigen Autoren über die dritte Stufe der Renaturierung in auf diese Art renaturierten Lösungen auf folgende Weise vervollständigt werden:

Der größte Teil der sich bildenden Aggregate gewinnt nicht die stäbchenförmige Gestalt der nativen Moleküle zurück. Dies wird durch die geringe Erhöhung der Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung ($\text{tg } \alpha$) während der Renaturierung bewiesen. Aus der beobachteten Zunahme des $\text{tg } \alpha$ läßt sich grob abschätzen, daß maximal 10 % der Teilchen unter den experimentellen Bedingungen (Denaturierung bis zur Vollendung der 2. Stufe; 90 Min. bei 38°C; Renaturierung 120 Std. bei 4° C) die asymmetrische Form der nativen Moleküle angenommen haben können.

Während durch diese Untersuchungen nur die Höchstmenge an Tropokollagen des nativen, stäbchenförmigen Typs, die mit den Lichtstreuungsdaten noch vereinbar ist, abgeschätzt werden konnte, wurde in der Ultrazentrifuge wirklich eine Komponente mit dem Sedimentationsverhalten nativer Moleküle in einem Anteil von etwa 10 % beobachtet (n-Komponente).

Ob diese n-Komponente wirklich mit dem ursprünglichen, nativen Tropokollagen völlig identisch ist, konnte bisher nicht bewiesen werden. Die hervorragende Übereinstimmung der Sedimentationskonstanten deutet jedoch darauf hin. Da es bekannt ist⁵⁶⁾, daß die denaturierte, in etwa 7 - 10 % (s. IV.2) anwesende γ -Komponente im reinen Zustand in der Lage ist, vollständig zu anscheinend nativen Molekülen zu renaturieren, läßt sich zum mindesten der größte Teil des beobachteten Anteils an renaturierten Material des nativen Typs durch diese erklären. Die renaturierte γ -Komponente ist nach Altgelt et al.⁷⁰⁾ vom nativen Tropokollagen ununterscheidbar.

Das restliche Material scheint nur die vorhergehenden Schritte der Strukturrückbildung (s. Harrington u. von Hippels 3-Stufenmechanismus, VI.1) zu durchlaufen und besonders bei höheren Konzentrationen unspezifischere Aggregate zu bilden. Dafür spricht der stark konzentrationsabhängige Anstieg des Gewichtsmittels des Molekulargewichts, gemessen mit der Lichtstreuung. Dieses mündet in keinen konstanten Wert ein, sondern bei höheren Konzentrationen wird sogar das Molekulargewicht des nativen Tropokollagens weit überschritten. Der gleichfalls konzentrationsabhängige Viskositätsanstieg ist bei höheren Konzentrationen, bei denen die Aggregation wesentlich wird, zum größten Teil durch die alleinige Molekulargewichtszunahme erklärbar. Dafür spricht die Gültigkeit der Staudingergleichung, die ja nur anwendbar ist, wenn sich während Zunahme des Molekulargewichts die Gestalt der Moleküle nicht wesentlich ändert. In der Ultrazentrifuge konnten die postulierten Aggregate bei niedrigen Temperaturen direkt sichtbar gemacht werden.

Die Ultrazentrifugenuntersuchungen haben gezeigt, daß die gebildeten Aggregate bereits bei relativ niedrigen Temperaturen wieder zerstört werden. Auch die optische Drehung fällt bereits bei geringer Temperaturerhöhung ab und die Denaturierungskurven zeigen, daß die Verteilung der pro Temperatureinheit zerstörbaren optisch aktiven Konfigurationen sehr

breit ist und ihr Maximum bei einer niedrigen Temperatur (26°C) besitzt. Man kann sich vorstellen, daß die optisch aktiven Konfigurationen, die bei 4° den gleichen Beitrag zur optischen Drehung liefern, in energetisch verschiedenen günstigen Anordnungen vorliegen und aus diesem Grunde bei verschiedenen hohen Temperaturen zerstört werden. Die Schärfe der Verteilung, die bei den nativen Molekülen außerordentlich groß ist, und die Temperatur (T_{max}), bei der die meisten Konfigurationen zerstört werden - diese ist demnach auch ein Maß für die Ordnung der Struktur -, sind beim bis zum Abschluß der zweiten Stufe denaturierten und isotherm bei 4°C renaturierten Material sehr weit von den Werten des nativen Tropokollagens verschieden. Trotzdem ist die Endschmelztemperatur d.h. die Temperatur, bei der die höchstgeordneten Konfigurationen schmelzen, selbst bei diesem Material mit der Endschmelztemperatur des nativen Tropokollagens identisch. Dies gilt auch für alle im folgenden besprochenen auf andere Weise besser renaturierten Tropokollagenlösungen und zeigt, daß eine grundsätzliche Ähnlichkeit zwischen der nativen und der renaturierten Struktur besteht.

Im Laufe weiterer Untersuchungen wurde gefunden, daß die isotherme Renaturierung bei 4° keineswegs zu einer bestmöglichen Rückbildung der nativen Struktur führt. Wechselt man während der Renaturierung mehrere Male die Temperatur (in dieser Arbeit wurde ziemlich willkürlich ein Wechsel zwischen 4° und 22° gewählt), so werden höhere Endwerte vor allem bei der Viskosität erreicht. Die η_{sp}/c -Werte für das vollständig denaturierte und durch Temperaturwechsel renaturierte Tropokollagen steigen bis auf das fünffache des "Endwertes" (wie erwähnt (s. VI.1) erreicht die Viskosität nie einen völlig konstanten Endwert) bei 4° , für das isotherm renaturierte Tropokollagen. Auch bei der optischen Drehung ist der Effekt auf den Endwert deutlich, aber auch bei isothermer Renaturierung kann durch mehrwöchiges Stehen bei 4° der Wert erreicht werden, der sich bei Temperaturwechsel innerhalb weniger Tage einstellt. Wesentlich ist aber,

der große Unterschied in der Denaturierungskurve dieses Materials gegenüber der des isotherm renaturierten Tropokollagens. Die Verteilung ist bedeutend schmalere und ihr Maximum liegt bereits bei einer höheren Temperatur (31°C). Das so renaturierte Material ist also in dieser Beziehung dem nativen ähnlicher.

Die sehr hohe Viskosität läßt sich auch kaum mehr durch eine bloße Aggregation erklären, vielmehr wird eine Erhöhung der Asymmetrie der Aggregate zum mindesten bei tiefen Temperaturen wahrscheinlich. Diese Folgerung scheint durch Ultrazentrifugenergebnisse bei tiefen Temperaturen gestützt zu werden. Da die durchschnittliche konfigurative Ordnung (aus den Denaturierungskurven) gegenüber dem isotherm renaturierten Material gestiegen ist, während die Menge an n-Komponente gleich blieb, liegt der Gedanke nahe, daß sich in diesen Aggregaten durch den Temperaturwechsel vielleicht kurze Stücke der Tripelhelix zurückgebildet haben.

Aus den Arbeiten von Altgelt et al.⁷⁰⁾ ist, wie erwähnt, bekannt, daß die γ -Komponente, in der chemische Bindungen das für das Wiederezusammenfinden wichtige, richtige Register zwischen den Ketten bewahren, in der Lage ist, sich beim Unterschreiten der Denaturierungstemperatur reversibel aus dem statistischen Knäuel zum nativen Molekül zurückzubilden. Da nach dem gefundenen 2-Stufen-Mechanismus der Denaturierung (s. V.6) nach der ersten Stufe noch eine allerdings thermisch labile Verbindung zwischen den Einzelketten postuliert werden muß, lag der Gedanke nahe, daß diese Zwischenstufe ähnlich wie die δ -Komponente in der Lage ist, wirklich native Moleküle zurückzubilden. Die Versuche an nur bis zur ersten Stufe denaturierten und sowohl isotherm und durch Temperaturwechsel renaturierten Tropokollagenlösungen haben gezeigt, daß der erreichte Renaturierungsgrad bei diesem Material wirklich weit besser ist, als bei vollständig denaturiertem Tropokollagen. Die Renaturierung verlief nach beiden Methoden rascher und die erreichte molekulare Ordnung, beurteilt durch die Denaturierungskurven, war besser. Die

durch Renaturierung unter Temperaturwechsel erreichte Schärfe der Verteilung, kommt der des nativen schon sehr nahe. In der Ultrazentrifuge zeigt sich ein sehr großer n-Peak, welcher eindeutig beweist, daß sich bei diesem Material an der Rückbildung von Molekülen des nativen Typs weit mehr als die γ -Komponente beteiligt hat.

Betrachtet man die Fähigkeit der verschiedenen denaturierten und verschiedenen renaturierten Tropokollagenlösungen, Fibrillen und Segmente zu bilden, so nimmt diese entsprechend der zurückgewonnenen Ordnung, gemessen am Denaturierungsverhalten der Lösungen, zu. Beim am vollständigsten renaturierten, d.h. vorher nur bis zum Abschluß der 1. Stufe denaturierten und unter Temperaturwechsel renaturierten Tropokollagen werden Fibrillen und Long-spacing-Segmente in der gleichen Ausbeute wie beim nativen gewonnen. Diese sind auch in ihrer Querstreifung von nativen Fibrillen ununterscheidbar. Die anders denaturierten und renaturierten Lösungen liefern ganz parallel zur zunehmenden Entfernung ihrer Denaturierungskurven von der des nativen Tropokollagens schlechter strukturierte Fibrillen und Segmente in geringerer Ausbeute. Dabei liegt diese aber besonders bei dem unter Temperaturwechsel renaturierten Material merklich höher, als durch die ausschließliche Beteiligung der in Lösung bestimmten Menge an Molekülen des nativen Typs (n-Komponente) erklärbar wäre. Dies deutet vielleicht daraufhin, daß sich am Aufbau der Fibrillen und Segmente auch unvollständig renaturierte Tropokollagenmoleküle beteiligen können. Allerdings macht die große Schwierigkeit bei der Abschätzung des Verhältnisses von strukturiertem zu unstrukturiertem Material im Elektronenmikroskop genauere quantitative Aussagen bisher unmöglich.

Die Ergebnisse an den beiden Extremfällen (vollständig denaturiert und isotherm renaturiert sowie Denaturierung bis zum Abschluß der 1. Stufe und Renaturierung unter Temperaturwechsel) lassen sich in einfacher Weise zusammenfassen: Eine Renaturierung bis zu Molekülen des nativen Typs (n-Komponente) scheint nur möglich, wenn die Ketten nach der Denaturierung noch zusammenhängen und dadurch das richtige Register

erhalten bleibt. Dabei scheint es gleichgültig, ob dieser Zusammenhalt durch chemische Bindungen oder durch thermolabile Verbrückungen, wie sie in der Zwischenstufe nach der 1. Denaturierungsstufe bestehen, bewirkt wird. Im ersten Fall renaturiert nur die geringe Menge an γ -Komponente, im zweiten der Hauptteil des Materials, da er in Form der Zwischenstufe vorliegt. In beiden Fällen ist die gebildete n-Komponente in der Lage, Fibrillen und Segmente zu bilden.

Nicht so eindeutig beantwortet werden konnte bisher die Frage, in welcher Weise die durch Denaturierung bis zum Abschluß der 2. Stufe vollständig getrennten Ketten in der Lage sind, zu Aggregaten zusammenzutreten, die wenigstens teilweise die native Tertiärstruktur zurückgewonnen haben. Unter den Bedingungen der isothermen Renaturierung scheint wirklich nur die γ -Komponente die n-Komponente zu bilden, während die getrennten Ketten (α - und β -Komponente) zu völlig unspezifischen Aggregaten zusammentreten. Wie erwähnt, deuten aber einige Anhaltspunkte daraufhin, daß sich bei der Renaturierung unter Temperaturwechsel auch diese Ketten so zusammenfinden, daß Stücke der Tripelhelix entstehen. Diese Punkte sind: Asymmetrische Aggregate in der Ultrazentrifuge, Verbesserung der mittleren strukturellen Ordnung - gemessen an den Denaturierungskurven - und die unerwartet hohe Ausbeute an Fibrillen und Segmenten bei unveränderter Menge an n-Komponente.

Einen weiteren Hinweis bedeutet die Parallelität der mit der optischen Drehung verfolgten Denaturierungskurven mit denen der Viskosität. Die $T_{\max}$ -Werte stimmen bei niedrigen Konzentrationen sehr gut überein. Daraus kann geschlossen werden, daß die Rückbildung der die Viskosität beeinflussenden äußeren Form der Aggregate (Größe und Achsenverhältnis) mit der Rückbildung der durch die optische Drehung angezeigten, konfigurativen inneren Ordnung der Moleküle wenigstens teilweise gekoppelt ist.

Beim Vergleich der Viskositäts- und Drehungskurven wirkt komplizierend, daß auf erstere natürlich auch jede unspezi-

fische Aggregation stark einwirkt. Diese wird durch höhere Konzentrationen begünstigt und bewirkt bei diesen eine grössere thermische Verteilung und niedrige $T_{\max}$ -Werte, da die Aggregate thermisch sehr labil sind. So erreicht eine vollständig denaturierte und unter Temperaturwechsel renaturierte Tropokollagenlösung durch ihre große Neigung zur unspezifischen Aggregation bei hohen Konzentrationen in der Kälte höhere Viskositätswerte als ein nur bis zur Vollendung der 1. Stufe denaturiertes und genauso renaturiertes Material. Im Gegensatz zu diesem werden die Aggregate in ersterem bereits wieder durch gelindes Erwärmen oder durch Verdünnung zerstört.

Es scheint eine lohnende Aufgabe weiterer Untersuchungen, die Renaturierung unter Temperaturwechsel z.B. mit der Lichtstreuung näher zu verfolgen. Eine weitere Kenntnis über die Renaturierungsprodukte aus vollständig denaturierten Lösungen könnte man vielleicht auch gewinnen, indem man auf das Gesamtmaterial Enzyme einwirken läßt, die nur das nicht native Eiweiß angreifen (s. I.3) und dadurch eine Isolierung der nativen Strukturen erhält.

VII. VERZEICHNIS DER IN DER ARBEIT VERWENDETEN SYMBOLE

A	Fläche unter der Kurve der dn/dx nach x - Diagramme (s. Abb. 2)
a_b	Beharrungslänge nach Peterlin (s. II.12)
a_F	Wurzel aus dem mittleren Quadrat des Fadenendenabstandes ($\text{\AA}$).
a	kleine Halbachse eines als Rotationsellipsoid angenommenen Moleküls ($\text{\AA}$)
b	große Halbachse eines als Rotationsellipsoid angenommenen Moleküls ($\text{\AA}$)
B u. C	2. und 3. Virialkoeffizient d. osmotischen Druckes
c	Konzentration (g/100 ml)
d	Durchmesser eines Stäbchenförmigen Moleküls ($\text{\AA}$)
$D_{T,P}^c$	Diffusionskoeffizient (cm^2/sec) gemessen bei $T^\circ\text{C}$ im Puffer P bei der Eiweißkonzentration c
$D_{20,w}^o$	Diffusionskonstante (cm^2/sec) auf Standardbedingungen - 20°C in Wasser - umgerechnet und auf die Eiweißkonzentration $c = 0$ extrapoliert
E^*	Aktivierungsenergie (kcal/mol)
F	Vergrößerungsfaktor
ΔF^*	Freie Energie der Aktivierung (kcal/mol)
ΔF	Freie Energie (kcal/mol)
f	Reibungskoeffizient
f_P	Korrekturfaktor für die Depolarisation des Streulichtes durch die Moleküle (s. Gleichung 15)
h	Planck'sches Wirkungsquantum = $6,624 \cdot 10^{-27}$ erg sec
H	Höhe der dn/dx nach x - Diagramme (s. Abb. 2)
ΔH^*	Aktivierungswärme (kcal/mol)
k	Boltzmann'sche Konstante = $1,38 \cdot 10^{-16}$ erg/grad
k', k'', k'''	Konstanten, Bedeutung nach Text
k_I	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion 1. Ordnung (1/sec.)
k_{II}	Geschwindigkeitskonstante einer Reaktion 2. Ordnung (100 ml/g sec)
K	Optische Konstante bei der Lichtstreuung (s. Gl. 15)
l	Länge eines stäbchenförmigen Moleküls ($\text{\AA}$)
M	Molekulargewicht einer molekulareinheitlichen Substanz
M_n	Zahlenmittel des Molekulargewichts
M_w	Gewichtsmittel des Molekulargewichts

N	Loschmidt'sche Zahl = $6,02 \cdot 10^{23}$ (1/mol)
n	Brechungsindex
n_i	Menge einer Komponente i (mol)
P_θ	Streufunktion (s. Gleichung 15)
q	Exponent der Staudingergleichung (s. Gleichung 13)
r_T	Wurzel aus dem mittleren Quadrat des Trägheitsradiuses ($\text{\AA}$)
R	reduzierte Streustrahlung (1/cm) (s. Gleichung 15)
$s_{T,P}^C$	Sedimentationskoeffizient (sec), Indices wie bei D
$s_{20,w}^{20,P}$	Sedimentationskonstante (sec), Indices wie bei D
$\Delta S^{\ddagger,w}$	Aktivierungsentropie (cal/grad mol)
ΔS	Entropie (cal/grad mol)
t	Zeit (sec, min, Std)
T	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$, $^{\circ}\text{K}$)
$\text{tg} \alpha$	Anfangsneigung der Winkelabhängigkeit der Lichtstreuung (g/cm^2)
v	Peterlin - Parameter (s. Gleichung 23)
$\bar{v}$	Partialvolumen = das von 1 g Eiweiß in Lösung eingenommene Volumen (ml/g)
V	Volumen eines Moleküls (cm^3)
w	Solvatationsgrad = die an 1 g Eiweiß gebundene Menge Lösungsmittel in g
x	Zellkoordinate in Diffusions- bzw. Sedimentationsrichtung
$[\alpha]_{405\text{m}/\mu}$	spezifische optische Drehung bei $\lambda = 405 \text{ m}/\mu$
β	Scheraga-Mandelkern-Faktor (s. Gleichung 12)
	Viskosität (Poise (P) = 100 cP)
η_{rel}	relative Viskosität = $\eta_{\text{Lösung}} / \eta_{\text{Puffer}}$
η_{spez}	spezifische Viskosität = $\eta_{\text{rel}} - 1$
$[\eta]$	Viskositätszahl = $\lim_{c \rightarrow 0} \eta_{\text{spez}} / c$
φ	Winkel zum Primärlicht, unter dem das Streulicht gemessen wurde
λ	Wellenlänge
μ	Ionenstärke
ν	wahres Viskositätsinkrement (s. Gl. 16)
ν	scheinbares " "
ρ	Dichte (g/ml)
ω	Winkelgeschwindigkeit (Winkelgrad/sec)

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

Das Molekulargewicht und die Abmessungen von Tropokollagen der Kalbshaut in saurer Lösung wurden mit der Lichtstreuung, der Ultrazentrifuge und der Viskosität bestimmt. Dabei erwies sich das neutral extrahierbare Tropokollagen mit dem aus der gleichen Haut auf zwei verschiedene Arten (mit Citratpuffer und Essigsäure) sauer extrahierten Material im nativen Zustand als völlig identisch. Der sicherste Wert für das Molekulargewicht beträgt 3,3 bis 3,6 10^5 . Das native Molekül besitzt in Lösungen die Form eines Stäbchens mit einer Länge von 2800 - 3200 Å und einem Durchmesser von 13,5 Å. Aus einer Peterlin-Analyse der Lichtstreuungsdaten geht hervor, daß die Moleküle trotz ihrer hohen Asymmetrie überraschend unflexibel sind.

Im denaturierten, sauer extrahierten Tropokollagen wurde neben den bekannten α - und β -Komponenten eine neue schneller sedimentierende γ -Komponente gefunden, die wahrscheinlich mit der von anderen Autoren aus in renaturierten Lösungen gefällten Long-spacing-Segmenten gewonnenen, γ -Komponente identisch ist. Die Molekulargewichte wurden aus den in der Mischung gemessenen Sedimentationskonstanten zu $M = 115000 \pm 10 \%$; $M = 215000 \pm 10 \%$; $M = 290000 \pm 15 \%$ bestimmt. Alle Komponenten besitzen die Form statistischer Knäuel. In zwei verschiedenen Häuten wurde das molare Verhältnis von $\alpha:\beta = 1:1$ neben etwa 8 Mol-% der γ -Komponente gefunden. Während zwischen dem mit Citratpuffer und Essigsäure extrahierten Material kein Unterschied bestand, wurde in den denaturierten, neutral extrahierten Tropokollagenlösungen keine γ -Komponente und sehr wenig β neben viel α gefunden.

Da das neutral lösliche Tropokollagen als biologische Vorstufe des nur sauer extrahierbaren bekannt ist, liegt die Vorstellung nahe, daß das Tropokollagenmolekül im Laufe der Biosynthese zunächst aus drei einzelnen α -Ketten gebildet wird (Typ I). Das Auftreten der anderen Komponenten kann damit gedeutet werden, daß erst später vielleicht parallel zu der intermolekularen Vernetzung eine intramolekulare

Verbrückung stattfindet, die zunächst zu Molekülen führt, die aus einer α - und einer β -Komponente bestehen (Typ II). Bei statistischer Vernetzung gleichzeitig (aber in kleineren Mengen) entstehen durch Verbindung aller drei Ketten Moleküle (Typ III), welche denaturiert die γ -Komponente ergeben. Die nach dieser Annahme möglichen drei Molekülarten I, II und III unterscheiden sich im nativen Zustand nicht. Nach dieser Vorstellung wird sich mit fortschreitender Vernetzung das molare Verhältnis von $\beta:\alpha$ erhöhen und bei einem Material, in dem keine Moleküle der Art I mehr vorliegen, den Wert 1 erreichen. Eine weitere Vernetzung erhöht nur den Anteil der Molekülart III gegenüber II, wodurch sich im denaturierten Zustand die Menge der γ -Komponente bei unverändertem Verhältnis von $\alpha:\beta = 1:1$ erhöht.

Es wurde gezeigt, daß der Denaturierungsvorgang aus zwei aufeinanderfolgenden Stufen besteht. In der ersten Stufe bricht die stäbchenförmige Form der Tropokollagenmoleküle zusammen, was durch den raschen Abfall der Anfangsneigung der Lichtstreuung und der Viskosität angezeigt wird. Parallel dazu, aber nach einer anderen Kinetik, verläuft die Abnahme der inneren konfigurativen Ordnung der Moleküle, welche durch die gleichschnelle Abnahme der optischen Drehung gemessen wird. Erst in einer zweiten, langsameren Stufe tritt ein Zerfall in die Einzelkomponenten ein, der durch die Abnahme des Gewichtsmittels des Molekulargewichts, gemessen mit der Lichtstreuung, verfolgt werden kann.

Für die Renaturierung wurde gefunden, daß die bisher meist angewendete, isotherme Renaturierung nach Abschrecken der vollständig denaturierten Lösung auf möglichst tiefe Temperaturen nur eine schlechte Rückkehr einer kollagenähnlichen Struktur ermöglicht. Durch Lichtstreuungs- und Ultrazentrifugenmessungen konnte gezeigt werden, daß unter diesen Bedingungen nur etwa 10 % des gesamten vorher bis zur Vervollständigung der zweiten Stufe denaturierten Tropokollagens die stäbchenförmige Gestalt der nativen Moleküle zurückgewinnt. Dieser Anteil kann aus der γ -Komponente stammen, deren Fähigkeit vollständig zu renaturieren, bekannt ist. Der größte Teil des

Materials durchläuft nur die ersten beiden Schritte des von Harrington und Hippel vorgeschlagenen Mechanismus, durch die die Helix-Struktur innerhalb der Einzelkette zurückgebildet wird. Durch Lichtstreuungs- und Viskositätsmessungen konnte gezeigt werden, daß diese Einzelhelices in Abhängigkeit von der Konzentration unspezifische und durch gelinde Temperaturerhöhung wieder zerstörbare Aggregate bilden, deren Molekulargewichte bei höheren Konzentrationen weit größer als das des nativen Tropokollagens sein können. Als Kriterium für die rückgebildete strukturelle Ordnung wurde nach der Renaturierung stufenweise unter Verfolgung der optischen Drehung und Viskosität wieder denaturiert. Dabei zeigte sich, daß bereits bei geringer Temperaturerhöhung ein grosser Teil der optisch aktiven Konfiguration wieder zerstört wird. Die Denaturierung erstreckt sich über einen großen Temperaturbereich und das Maximum dieser Verteilung liegt bei verhältnismäßig niedrigen Temperaturen.

Ein bedeutend besserer Renaturierungseffekt wird durch Abwechseln der Temperatur während des Vorganges erreicht. Die Verteilungsbreite der Renaturierung ist kleiner und ihr Maximum liegt bei höheren Temperaturen. Diese Lösungen haben sich in ihrem Denaturierungsverhalten bereits den nativen Lösungen angenähert. Auch die erreichten Endwerte sind besonders bei der Viskosität höher als bei isothermer Renaturierung. Die Menge an wirklich stäbchenförmigen Molekülen des nativen Typs, die noch bei 22° beständig ist, scheint sich jedoch, wie aus den Ultrazentrifugenergebnissen hervorgeht, nicht wesentlich erhöht zu haben.

Noch weit besser ist die erreichte Renaturierung von nur bis zum Abschluß der ersten Stufe denaturierten Tropokollagenlösungen. Auch hier erweist sich die Renaturierung unter Abwechseln der Temperatur der isothermen als überlegen. Der durch die Temperaturschwankungen bewirkte Effekt kann mit dem Auskristallisieren abgeschreckter Schmelzen verglichen werden. Die Denaturierungskurve hat sich der des nativen Tropokollagens stark angenähert. Die Parallelität der mit der optischen Drehung und der Viskosität verfolgten Denatu-

rierung sowie die hohe Viskosität deuten auf eine Rückkehr wirklich nativer Strukturen. Vorläufige Ultrazentrifugenergebnisse haben ergeben, daß ein großer Teil des Materials anscheinend wirklich Moleküle des nativen Typs zurückgebildet hat. Dieses Ergebnis war auch nach der, aus der Untersuchung des Denaturierungsmechanismus hervorgegangenen, Vorstellung zu erwarten, daß die Einzelketten des zusammengebrochenen Tropokollagenmoleküls nach der ersten Stufe noch zusammenhängen. Dieser Zusammenhang erhält wahrscheinlich ähnlich wie in der γ -Komponente das richtige Register zwischen den Ketten und ermöglicht so ein schnelleres Wiederezusammenfinden, welches zu einer besseren Ordnung führt.

Aus den verschiedenen renaturierten Lösungen wurden durch Dialyse gegen Phosphatpuffer und Wasser bzw. ATP-Lösung Fibrillen und Long-spacing-Segmente ausgefällt. Bei dem nur bis zur ersten Stufe denaturierten und unter Temperaturwechsel renaturierten Tropokollagen waren diese in Ausbeute und Strukturierung von den aus nativen Lösungen gewinnbaren ununterscheidbar. Der andere Extremfall einer bis zur Vollendung der zweiten Stufe denaturierten und nur isotherm renaturierten Tropokollagenlösung lieferte schlecht strukturierte Fibrillen und Segmente in schwer schätzbarer, jedoch wesentlich geringerer Ausbeute. Die nach den physikalisch-chemischen Untersuchungen im Grad ihrer Renaturierung zwischen diesen Extremen liegenden Tropokollagenlösungen (vollständig denaturiert und unter Temperaturwechsel renaturiert sowie nur bis zum Ende der ersten Stufe denaturiert und isotherm renaturiert) liegen auch in ihrer Fähigkeit, Fibrillen und Segmente zu bilden, dazwischen. Da die Ausbeute an Fibrillen allgemein höher zu liegen scheint als die vorher in der Lösung anwesende Menge an Molekülen des nativen Typs, scheinen sich an der Fibrillenbildung auch unvollständig renaturierte Moleküle beteiligen zu können.

IX. LITERATUR

1. K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Z.Naturforschg. 13b 154 (1960)
2. U.Hofmann, Th.Nemetschek u. W.Graßmann, Z.Naturforschg. 7b 509 (1952)
3. K.Kühn, W.Graßmann, u. U.Hofmann, Naturwiss. 44 538 (1957)
4. K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Das Leder 11 110 (1960)
5. C.E.Hall, M.A.Jakus u. F.O.Schmitt, J.Amer.Chem. Soc. 64 1234 (1942)
6. C.Wolpers, Klin.Wochenschr. 22 624 (1943); 23 169 (1944)
7. F.O.Schmitt, Proc.Nat.Acad.Sci. 46 186,197 (1960)
8. F.O.Schmitt u. A.J.Hodge, Das Leder 11 74 (1960)
9. K.Kühn, W.Graßmann u. U.Hofmann, Naturwiss. 47 258 (1960)
10. A.Rich u. F.H.C.Crick in "Recent Advances in Gelatine and Glue Research" (Herausg. G. Stainsby) S.20, Pergamon Press, London, 1958
11. A. Rich u. F.H.C.Crick, J.Mol.Biol. 3 483 (1961)
12. I.Nageotte, C.R.hebd.Sci.Acad.Sci. 184 115 (1927)
13. W.N.Orechowitsch, A.A.Tustanowsky, K.D.Orechowitsch u. N.J.Plotnikowa, Biochimija (UdSSR) 13 55 (1948)
14. J.Gross, J.H.Highberger u. F.O.Schmitt, Proc.Nat. Acad.Sci. 41 1 (1955)
15. W.N.Orechowitsch, Communications et Rapports au IIIe Congrès international de Biochimie, Brüssel, 1955
16. J.Gross, J.Biophys.Biochem.Cytol. 2 261 (1956)
17. F.O.Schmitt, J.Gross u. J.H.Highberger, Proc.Nat. Acad.Sci. 39 459 (1953)
18. P.Doty u. T.Nishihara, in "Recent Advances in Gelatine and Glue Research" (Herausg. G.Stainsby) S.92, Pergamon Press, London, 1958
19. W.N.Orechowitsch, W.O.Schpikiter, W.I.Mazurow u. O.W.Kounina, Bull.Soc.Chem.Biol. 42 505 (1960)

20. W.N.Orechowitsch u. W.O.Schpikiter in "Recent Advances in Gelatine and Glue Research" (Herausg. G.Stainsby), S. 87, Pergamon Press, London, 1958
21. P.H.v.Hippel, P.M.Gallop, S.Seifter u. R.S.Cunningham, J.Amer.Chem.Soc. 82 2774 (1960)
22. P.J.Flory u. R.R.Garrett, J.Amer.Chem.Soc. 80 4836 (1958)
23. P.H.v.Hippel u. W.F.Harrington, Proceeding Symposion Protein Structure and Function, Brookhaven National Laboratories, June 6-8, No. 13, S. 213 (1960)
24. W.F.Harrington u. P.H.v.Hippel, Arch.Biochem.Biophys. 92 109 (1961)
25. P.J.Flory u. E.S.Weaver, J.Amer.Chem.Soc. 82 4518 (1960)
26. R.V.Rice, Proc.Nat.Acad.Sci. 46 1186 (1960)
27. P.M.Gallop, Arch.Biochem.Biophys. 54 486 (1955)
28. J.Gross, J.Exptl.Med. 107 247 (1958)
29. K.A.Piez, E.Weiss u. M.S.Lewis, J.Biol.Chem. 235 1987 (1960)
30. P.Doty u. J.T.Edsall in "Advances in Protein Chemistry" (Herausg. K.M.L.Anson, J.T.Edsall u. K.Bailey) 6 55 (1951)
31. M.B.M'Ewen u. M.J.Pratt in "Nature and Structure of Collagen" (Herausg. J.T.Randall), Butterworth Scientific Publications, London, 1953
32. H.Svensson, Acta Chem.Scand. 5 1301 (1951)
33. L.Gosting u. M.S.Morris, J.Amer.Chem.Soc. 71 1998 (1949)
34. E.Wiedemann, Chem.Ing.Technik 28 263 (1956)
35. H.K.Schachman "Ultracentrifugation in Biochemistry" Academic Press, New York, (1960)
36. H.Boedtker u. P.Doty, J.Amer.Chem.Soc. 78 4267 (1956)
37. Th.Bücher u. D.Moring in "Handb. der physiologischen und pathologisch-chemischen Analyse", Hoppe-Seyler/Thierfelder (Herausgeb. K.Lang u. E.Lehnartz) Bd. II, Teil 2, S. 115, Springer-Verlag (1955)
38. J.J.Hermann u. S.Levinson, J.Opt.Soc.Amer. 41 460 (1951)
39. M.Gehatia, Naturwiss. 48 1 (1961)
40. H.Scheraga u. L.Mandelkern, J.Amer.Chem.Soc. 75 179 (1953)

41. J.W.Williams, W.M.Saunders u. J.S.Cicirelli, J.phys. Chem. 58 774 (1954)
42. H.J.Cantow in "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), Bd. III, Teil 1, S. 409, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1955
43. B.H.Zimm, J.Chem.Phys. 16 1093 (1948)
44. J.W.Mehl, J.L.Oncley u. R.Simha, Science 92 132 (1940)
45. F.Perrin, J.Phys.Radium, 7 1 (1936)
46. A.Peterlin, J.Polym.Sci. 47 403 (1960)
47. K.A.Stacy in "Light-Scattering in Physical Chemistry" Butterworth Scientific Publications, London, 1956
48. H.Noda, Biochim.Biophys.Acta 17 92 (1955)
49. E.G.Young, u. J.W.Lorimer, Arch.Biochem.Biophys. 92 183 (1961)
50. J.H.Feßler, Biochem.J. 76 452 (1960)
51. T.Nishihara u. P.Doty, Proc.Nat.Acad.Sci.US, 44 411 (1958)
52. O.W.Kazakowa, W.N.Orechowitsch u. W.O.Schpikiter, Dokl.Akad.Nauk. UdSSR, 120 359 (1958)
53. W.N.Orechowitsch u. W.O.Schpikiter, Biochimija 20 438 (1955)
54. E.H.L.Chun u. P.Doty, Abstracts Miami Meeting of the Amer.Chem.Soc. (1957)
55. E.G.Young u. J.W.Lorimer, Arch.Biochem.Biophys. 88 373 (1960)
56. K.A.Piez, M.S.Lewis, G.R.Martin u. J.Gross, Biochim. Biophys. Acta 53 596 (1961)
57. G.R.Martin, J.Gross, K.A.Piez u. M.S.Lewis, Biochim. Biophys. Acta 53 599 (1961)
58. A.J.Altgeld, A.J.Hodge u. F.O.Schmitt, Abstracts, Fifth Annual Meeting of the Biophysical Society, St.Louis, Missouri (1961)
59. A.Veis, A.Anesev, J.Cohen, Arch.Biochem.Biophys. 94 20 (1961)
60. W.Graßmann, K.Hannig u. M.Schleyer, Z.Physiol.Chem. 322 71 (1960)

61. O.Kling, Acta Chem.Scan. 15 229 (1961)
62. F.W.Putnam in "The Proteins" (Herausg. H.Neurath u. K.Bailey) Vol. I, Teil B, S. 860, Academic Press, New York, 1953
63. M.Daskowski u. H.A.Scheraga, J.Amer.Chem.Soc. 83 266 (1961)
64. C.Cohen, J.Biophys.Biochim.Cytol. 1 203 (1955)
65. C.R.Smith, J.Amer.Chem.Soc. 41 135 (1919); 1 203 (1955)
66. C.Robinson u. M.J.Bott, Nature 168 325 (1951)
67. E.M.Bradbury, R.E.Burge, J.T.Randall u. G.R.Wilkinson, Dio.Faraday Soc. 25 173 (1958)
68. J.R.Katz, Rec.trav.chim. 51 835 (1932)
69. R.S.Bear, Advances in Protein Chemistry (Herausg. K.M.L.Anson, J.T.Edsall u. K.Bailey) 7 124 (1952)
70. K.Altgeld, A.Hodge u. F.O.Schmitt, Proc.Nat.Acad. Sci.US, 47 1914 (1961)

L e b e n s l a u f

Am 15. März 1935 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Hans-Günter Engel und seiner Ehefrau Emilie in Berlin-Pankow geboren. Die Reifeprüfung legte ich im März 1954 an der Rheingau-Oberschule in Berlin-Friedenau ab.

Nach Absolvierung eines halbjährigen Industriepraktikums bei der Firma Siemens und Halske AG, Berlin, begann ich im Herbst 1954 mit dem Chemie-Studium an der Technischen Universität in Berlin-Charlottenburg. Vom 3. Semester an setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und legte dort die Diplomchemiker-Vorprüfung im Dezember 1957 und vier Semester später das Hauptexamen ab. Zur Finanzierung meines Studiums habe ich in fast allen Semesterferien als Werkstudent in der chemischen Abteilung des Rundfunkröhrenwerkes der Siemens und Halske AG, München, gearbeitet.

Seit Dezember 1959 arbeitete ich im Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung an der vorliegenden Arbeit. Dort wurde ich ab November 1960 mit einer Hilfsassistenten- und später Assistentenstelle betraut.

